

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表平11-500832

(43)公表日 平成11年(1999) 1月19日

(51)Int.Cl. ⁹	識別記号	F I	
G 0 1 J 3/45		G 0 1 J 3/45	
A 6 1 B 3/00		A 6 1 B 3/00	Z
3/12		5/00	1 0 1 A
5/00	1 0 1	10/00	E
10/00		G 0 1 B 11/00	G
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 136 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平9-522259	(71)出願人	スペクトラル ダイアグノスティック リミテッド イスラエル国、ミグダル ハエメク 10551、ビーオーボックス 101
(86) (22)出願日	平成8年(1996)12月10日	(72)発明者	ユバル ガリニ イスラエル国、ミツベ コラニト 20126、
(85)翻訳文提出日	平成9年(1997) 8月12日	(72)発明者	ニル カチール イスラエル国、ギパト エラー 23800、 ハガリル 3
(86)国際出願番号	PCT/US 9 6 / 2 0 0 2 4	(72)発明者	ダーク ジー ソエンクセン アメリカ合衆国、カリフォルニア 92008、 カールスパッド、チェシャイア 3638
(87)国際公開番号	WO 9 7 / 2 1 9 7 9	(74)代理人	弁理士 大西 正悟
(87)国際公開日	平成9年(1997) 6月19日		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	0 8 / 5 7 1 , 0 4 7		
(32)優先日	1995年12月12日		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(81)指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), IL, JP, US		

(54)【発明の名称】 生物学研究、医療診断および治療用の分光生物撮像法、蛍光交配方法および細胞分類方法

(57)【要約】
光の透過、反射、散乱および蛍光発光法を用い、高い空間および分光解像度で、空間的機構を検出し、細胞および組織成分、構造および、プローブや薬物等、投与された成分を定量するために用いることができる。本発明は、例えば、生体細胞の解剖および生理を研究し、単一の測定で多くの遺伝子および染色体を効果的にマップし、切片中の癌性もしくは他の病的な細胞および組織を顕微鏡下もしくは生体中でマクロレンズもしくははいずれかのタイプの内視鏡もしくは基底部カメラを通して、例えば除去すべき組織の手術中に手術医をガイドする目的で検出および同定するために、結果の解釈および有用な表示を主として強化された撮像形状で可能にする。

【特許請求の範囲】

1. 高い空間およびスペクトル解像度を特徴とする分光生物撮像方法であって、

(a) 分光撮像されるべきサンプルを調製する工程、

(b) そのサンプルを光学装置を通して観察する工程、この光学装置は撮像分光計に光学結合されており、光学装置および撮像分光計は、

(i) コリメート光学要素を用いてサンプルの全ピクセルから入射光を同時に収集し、

(i i) コリメートされた入射光を多数の要素を有する干渉計系に通し、まず、光が干渉計内部で異なった方向に進行する2つのコヒーレント光線に分割され、次いで2つのコヒーレント光線が再結合されて互いに干渉して出射光線が形成されるようにし、

(i i i) 出射光線を、検出器要素の2次元アレーを有する検出器上に出射光線を収束させる収束光学系に通し、各時点で検出器要素の各々がサンプルの1つの、全測定期間を通じて常に同一のピクセルであり、サンプルの実像は検出器アレー面上で固定され、測定中のあらゆる時点で像は可視かつ識別可能であり、各検出器要素は、異なる波長でピクセルから発せられる光の強度の特定の一次結合である信号を生成するようにし、この一次結合は瞬時光路差の関数とし、

(i v) 干渉計系の少なくとも1つの要素を回転し、干渉計系によって生成された2つのコヒーレント光線の間の光路差がサンプルの全ピクセルについて同時に走査されるようにし、

(v) 記録装置を用いて各検出器要素の信号を時間の関数として記録し、データの第1のスペクトルキューブを形成することによって

サンプルの各ピクセルのスペクトルを得るためのものである、および

(c) 数値アルゴリズムを用いて第1のスペクトルキューブを解釈する工程を含むことを特徴とする分光生物撮像方法。

2. さらに(d) 解釈されたデータのスペクトルキューブをマップする工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 前記光学装置は、顕微鏡、カメラレンズ、内視鏡、眼底カメラおよび眼底鏡

からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

4. 前記顕微鏡は、反射顕微鏡、透過顕微鏡、蛍光顕微鏡、直立（縦型）顕微鏡、倒立顕微鏡、暗視野顕微鏡、コンフォーカル顕微鏡、定在波コンフォーカル顕微鏡および反射コントラスト顕微鏡からなるグループから選択されることを特徴とする請求項3に記載の方法。

5. 前記平行光は、サンプルからの透過光、サンプルからの反射光、サンプルからの散乱光およびサンプルからの発光光からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

6. 前記サンプルからの前記発光光は、投与プローブ蛍光、投与プローブ励起蛍光および自己蛍光のグループから選択されることを特徴とする請求項5に記載の方法。

7. 光源から生成される前記光は、レーザー、白色光、フィルター透過光、紫外光および短波長レンジの光のグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

8. 前記光は複数の光源から生成され、これら光源は同時に作動されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

9. 前記光は複数の光源から生成され、これら光源は順次作動されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

10. 前記二次元アレイは、ビデオレートCCD、冷却高ダイナミックレンジCCD、増感DDCもしくは時間ゲート増感CCDのようなCCDか

8. 前記光は複数の光源から生成され、これら光源は同時にもしくは順次作動されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

11. 前記サンプルは細胞、組織および微生物からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

12. 前記細胞および組織は人体から採取されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

13. 前記細胞は、例えば、Pap染色により集められた細胞、血液細胞、胎児細胞、悪性腫の疑いのある細胞、分裂休止期の細胞、有糸分裂中細胞および還元

分裂中細胞であることを特徴とする請求項11に記載の方法。

14. 前記組織は、網膜、網膜血管、腫瘍、皮膚、角膜、髪、肺、胃、腸、膀胱、結腸、前立腺、頸部、動脈、静脈および心臓からなるグループから選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

15. 前記サンプルが網膜であり、前記方法が、網膜血管における酸化および脱酸化ヘモグロビンの検出用であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

16. 前記サンプルが網膜であり、前記方法が、網膜のメラニン色素沈着レベルの検出用であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

17. 前記サンプルが細胞、組織の一部および微生物からなるグループから選択され、前記光がプローブにより励起され、このプローブは特定の細胞成分に結合され、前記方法は細胞成分の存在もしくはそのレベルの検出用であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

18. 前記プローブは共役蛍光部分を含み、前記励起が蛍光部分の蛍光発光であることを特徴とする請求項17に記載の方法。

19. 前記プローブがさらに核酸分子を含み、前記方法がこの核酸分子と交配する細胞核酸の存在もしくはそのレベルの検出用であることを特徴とする請求項18に記載の方法。

20. 前記細胞核酸がデオキシリボ核酸およびリボ核酸からなるグループから選択されることを特徴とする請求項19に記載の方法。

21. 前記プローブが抗体を含み、前記方法が、この抗体により認識される細胞蛋白質の存在もしくはそのレベル検出用であることを特徴とする請求項17に記載の方法。

22. 前記蛍光部分が、SpectrumOrange™, SpectrumGreen™, Aqua, Texas-Red, FITC, ローダミン、フルオレスセイン、カスケードブルーおよびこれらの組み合わせからなるグループから選択されることを特徴とする請求項18に記載の方法。

23. 前記数学的アルゴリズムが、サンプルの各ピクセルのスペクトルのポイン

トオペレーション解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

24. 前記ポイントオペレーション解析が、サンプルにおける各ピクセルのスペクトルを変形関数に基づいてスカラーマッピングすることを含むことを特徴とする請求項23に記載の方法。

25. 前記ポイントオペレーション解析が、サンプルにおける各ピクセルのスペクトルを変形関数に基づいて別のスペクトルにマッピングすることを含むことを特徴とする請求項23に記載の方法。

26. 前記数学的アルゴリズムが形態学解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

27. 前記数学的アルゴリズムが類似マッピング解析であり、これにより

サンプルの各ピクセルにおける参照スペクトルからのスペクトル差を計算することを特徴とする請求項1に記載の方法。

28. 前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは疑似カラーイメージを作りだし、明るいピクセルが小さなスペクトル差に対応し、暗いピクセルが大きなスペクトル差に対応することを特徴とする請求項27に記載の方法。

29. 前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは疑似カラーイメージを作りだし、ここでは明るいピクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いピクセルが小さなスペクトル差に対応することを特徴とする請求項27に記載の方法。

30. 前記スペクトル差が、各ピクセルのスペクトルと参照スペクトルとの差の絶対値を所定波長レンジにおいて積分して定義されるスカラーであることを特徴とする請求項27に記載の方法。

31. 前記数学的アルゴリズムが分類マッピング解析であり、これにより、各ピクセルのスペクトルにおけるいくつかの参照スペクトルからのスペクトル差を計算することを特徴とする請求項1に記載の方法。

32. 前記分類マッピング解析が疑似カラーイメージを作り出し、このイメージにおいていくつかの参照スペクトルの一つに対して所定最大スペクトル差を有する一群のピクセルが所定疑似カラーにより着色されることを特徴とする請求項31に記載の方法。

33. 前記スペクトル差が、各ピクセルのスペクトルと前記いくつかの参照スペクトルの一つとの差の絶対値を所定波長レンジにおいて積分して定義されるスカラーであることを特徴とする請求項31に記載の方法。

34. 前記数学的アルゴリズムが主要コンポーネント解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

35. 前記主要コンポーネント解析が、

(a) 全測定ピクセルおよび波長、なお、複数波長が用いられるときには励起光源の波長を含む、の共変マトリクスを構築し、

(b) この共変マトリクスを対角化するとともに全直交スペクトルベースエレメントを見つけだし、

(c) どのベースエレメントがサンプルの所定特徴を有するかを探し出すようになっていることを特徴とする請求項34に記載の方法。

36. 前記数学的アルゴリズムが一次結合解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

37. 前記一次結合解析が、前記第1のスペクトルキューブデータおよび前記第2のスペクトルキューブデータに属する一対の対応ピクセルの対応波長間に算術関数を適用して、第3スペクトルキューブデータを求めるようになっていることを特徴とする請求項36に記載の方法。

38. 前記一次結合解析は、二つのスペクトルキューブデータの平均演算、時間変化追跡およびスペクトル正規化からなるグループから選択される

ことを特徴とする請求項36に記載の方法。

39. 前記一次結合解析は、算術関数によって各ピクセルのスペクトル波長の全てに所定スカラーを与えるものであり、この算術関数は加算、減算、乗算、除算およびこれらの組み合わせからなるグループから選択されることを特徴とする請求項36に記載の方法。

40. 前記一次結合解析はバックグラウンドの除去に用いられ、サンプルのバックグラウンド部に位置するピクセルのスペクトルがサンプルのピクセルのスペクトルから引き去られることを特徴とする請求項36に記載の方法。

41. 前記一次結合解析が校正処理に用いられ、サンプル観察前に測定されたスペクトルがサンプルのピクセルのスペクトルを除するために用いられることを特徴とする請求項36に記載の方法。

42. 前記数学的アルゴリズムが光密度解析であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

43. 前記光密度解析が光密度マップである変換イメージを得るためのものであることを特徴とする請求項42に記載の方法。

44. 前記数学的アルゴリズムは予め設定された波長レンジを用いてRGBカラーイメージを計算することを特徴とする請求項1に記載の方法。

45. 前記数学的アルゴリズムはピクセルの各スペクトル用の二つの異なる

波長間の比を算出することを特徴とする請求項1に記載の方法。

46. 前記数学的アルゴリズムはピクセルの各スペクトル用の二つの異なる波長間の比を算出し、このように算出された比に応じて、各ピクセルを明色もしくは暗色の人工色で着色することを特徴とする請求項1に記載の方法。

47. 前記方法は、サンプルに投与された多重蛍光搬送体のスペクトル特定を行うために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

48. 前記方法は、サンプルにおけるミクロ的な環境変化を検出するために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

49. 前記ミクロ的な環境変化は、局所的な電位、pHレベルおよび細胞間のイオン集中からなるグループから選択されることを特徴とする請求項48に記載の方法。

50. 前記イオンが水素イオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオンおよびカルシウムイオンからなるグループから選択されることを特徴とする請求項49に記載の方法。

51. 前記方法は前記サンプル内の自然成分からの自己蛍光を測定するために用いられことを特徴とする請求項1に記載の方法。

52. 前記自然成分が、葉緑素、ポルフィリンおよび細胞質蛋白からなるグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

53. 前記サンプルが、網膜、網膜血管、腫瘍、皮膚、角膜、髪、肺、胃、腸、膀胱、結腸、前立腺、頸部、動脈、静脈、心臓およびスミア細胞からなるグループから選択されることを特徴とする請求項51に記載の方法。

54. 前記方法は、生物学研究、薬品開発産業、病理学における細胞および組織分類、血液学、尿中のバクテリアの存在解析、染色体中での遺伝子識別およびマッピング、遺伝子病診断、細胞器官解剖学および生理学、細胞核におけるクロマチン分配および凝縮、細胞質器官および成分マッピング、核皮膜マッピング、皮膚癌のマッピング、黒色腫およびほくろの選別、ポートワイン母斑、および光力学的治療の前、間および後の皮膚画像作成からなる用途グループから選択される用途のために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

55. 前記細胞質成分は NAD^+ 、 NADH 、フラビンおよびチトクロームからなるグループから選択されることを特徴とする請求項54に記載の方法。

56. 前記方法は、サンプルにおける少なくとも二つの蛍光間の空間分離を決定する蛍光共鳴エネルギー移転を測定するために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

57. 前記蛍光搬送体のうちの少なくとも一つはサンプルに外部から投与されることを特徴とする請求項56に記載の方法。

58. 前記サンプルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサンプルにおける細胞および細胞レベル以下の詳細の認識およびマッピングを行うために用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

59. 前記サンプルは Romanowsky-Giemsa 着色法、Haematoxylin-Eosin 着色法および May-Grunwald-Giemsa 着色法からなるグループから選択された方法により着色されることを特徴とする請求項58に記載の方法。

60. 前記細胞レベル以下の詳細は、核におけるクロマチン組織のタイプであり、このタイプは異質染色質および真正染色質からなるグループから選択されることを特徴とする請求項59に記載の方法。

61. 前記サンプルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサンプルにおける生命プロセスを時間を関数としてモニターするため

に用いられることを特徴とする請求項1に記載の方法。

62. 次のステップからなる蛍光交配方法であり、

- (a) 少なくとも一つの蛍光染料を用いて少なくとも一つの核酸分子を特定し、少なくとも一つの蛍光追跡核酸プローブを得るステップ、
- (b) 生物サンプルの細胞核酸と前記プローブとを交配させるステップ、
- (c) 蛍光顕微鏡を通して生物サンプルを観察するステップ、

この蛍光顕微鏡は撮像分光計に光学的に繋がり、これら蛍光顕微鏡および撮像分光計は生物サンプルの各ピクセルのスペクトルを次のステップに基づいて得る

- (i) 平行光学系を用いて生物サンプルの全ピクセルからの射出光を

同時に集光するステップ、

- (ii) この射出平行光をたくさんのエレメントを有する干渉計システムを通過させるステップ、

これにより、まず干渉計内を異なる方向に流れる二つの干渉ビームに分離され、そして、これら二つの干渉ビームが互いに干渉して再結合され励起ビームが作られる、

- (iii) この励起ビームを合焦光学システムを通過させて二次元配列の検出エレメントを有する検出器に合焦させるステップ、

これにより、各瞬間において、各検出エレメントがイメージの一部であり、測定の全期間において生物サンプルにおける同一ピクセルとなり、これにより生物サンプルの実際のイメージが検出器アレイの面上で静止され、測定中いつでもこのイメージを観察でき且つ認識でき、このため、各検出エレメントが異なる波長におけるピクセルから射出される光強度の一次結合である信号を発生し、一次結合は瞬間的な光路差の関数である、

- (iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させるステップ、

これにより、この干渉計システムによって作られた二つの干渉ビーム間の光路差が、生物サンプルの全ピクセルについて同時に走査され、

- (v) 第1スペクトルキューブデータを形成するために記録装置を用いて時

間の関数として各検出エレメントの信号を記録するステップ、

(d) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スペクトルキューブデータを変換するステップ

からなることを特徴とする蛍光交配方法。

63. 次のステップからなる蛍光交配方法であり、

(a) 少なくとも一つの核酸プローブと生物サンプルの細胞核酸とを交配させるステップ、

(b) 前記少なくとも一つのプローブを少なくとも一つの蛍光染料により特定するステップ、

(c) 蛍光顕微鏡を通して生物サンプルを観察するステップ、

この蛍光顕微鏡は撮像分光計に光学的に繋がり、これら蛍光顕微鏡および撮像分光計は生物サンプルの各ピクセルのスペクトルを次のステップに基づいて得る

(i) 平行光学系を用いて生物サンプルの全ピクセルからの射出光を同時に集光するステップ、

(ii) この射出平行光をたくさんのエレメントを有する干渉計システムを通過させるステップ、

これにより、まず干渉計内を異なる方向に流れる二つの干渉ビームに分離され、そして、これら二つの干渉ビームが互いに干渉して再結合され励起ビームが作られる、

(iii) この励起ビームを合焦光学システムを通過させて二次元配列の検出エレメントを有する検出器に合焦させるステップと、

これにより、各瞬間において、各検出エレメントがイメージの一部であり、測定の全期間において生物サンプルにおける同一ピクセルとなり、これにより生物サンプルの実際のイメージが検出器アレイの面上で静止され、測定中いつでもこのイメージを観察でき且つ認識でき、このため、各検出エレメントが異なる波長におけるピクセルから射出される光強度の一次結合である信号を発生し、一次結合は瞬間的な光路差の関数である、

(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させるステップ、

これにより、この干渉計システムによって作られた二つの干渉ビーム間の光路差が、生物サンプルの全ピクセルについて同時に走査され、

(v) 第1スペクトルキューブデータを形成するために記録装置を用いて時間の関数として各検出エレメントの信号を記録するステップ、

(d) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スペクトルキューブデータを変換するステップ

からなることを特徴とする蛍光交配方法。

64. 前記数学的アルゴリズムが分類マッピング解析であり、これにより、各ピクセルのスペクトルにおけるいくつかの参照スペクトルからのスペクトル差を計算することを特徴とする請求項62に記載の方法。

65. 前記数学的アルゴリズムが一次結合解析であり、背景を除去するためのものであることを特徴とする請求項62に記載の方法。

66. 追加の数学的アルゴリズムとして分類マッピング解析を用いるステップをさらに有し、この追加数学的アルゴリズムにより前記各ピクセルのスペクトルに関して、少なくとも一つの参照スペクトルとのスペクトル差を計算することを特徴とする請求項65に記載の方法。

67. 前記分類マッピング解析が、前記各ピクセルのスペクトルに関して、少なくとも一つの参照スペクトルとのスペクトル差を計算するステップ

を含むことを特徴とする請求項64に記載の方法。

68. 前記分類マッピング解析が、前記各ピクセルのスペクトルに関して、少なくとも一つの参照スペクトルとのスペクトル差を計算するステップを含むことを特徴とする請求項66に記載の方法。

69. 細胞分類方法であって、

(a) 解析用の細胞スミアを準備するステップ、

(b) 透過顕微鏡により前記細胞スミアを観察するステップ、

なお、透過顕微鏡は撮像分光計と光学的に繋がり、透過顕微鏡および分光計は細胞スミアの各ピクセルのスペクトルを次のステップに基づいて得る、

(i) 平行光学系を用いて細胞スミアの全ピクセルからの射出光を同時に集光するステップ、

(ii) この射出平行光をたくさんのエレメントを有する干渉計システムを通過させるステップと、

これにより、まず干渉計内を異なる方向に流れる二つの干渉ビームに分離され、そして、これら二つの干渉ビームが互いに干渉して再結合され励起ビームが作られる、

(iii) この励起ビームを合焦光学システムを通過させて二次元配列の検出エレメントを有する検出器に合焦させるステップ、

これにより、各瞬間において、各検出エレメントがイメージの一部であり、測定の全期間において細胞スミアにおける同一ピクセルとなり、これにより細胞スミアの実際のイメージが検出器アレイの面上で静止され、測定中いつでもこのイメージを観察でき且つ認識でき、このため、各検出エレメントが異なる波長におけ

るピクセルから射出される光強度の一次結合である信号を発生し、なお、一次結合は瞬間的な光路差の関数であり、

(iv) 干渉計システムの一つもしくは複数の要素を回転させるステップ、

これにより、この干渉計システムによって作られた二つの干渉ビーム間の光路差が、細胞スミアの全ピクセルについて同時に走査され、

(v) 第1スペクトルキューブデータを形成するために記録装置を用いて時間の関数として各検出エレメントの信号を記録するステップ、

(c) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スペクトルキューブデータを変換するステップ

とからなることを特徴とする細胞分類方法。

【発明の詳細な説明】

生物学研究、医療診断および治療用の分光生物撮像法、蛍光交配方法および細胞分類方法

発明の分野及び背景

本発明はスペクトル法に関し、さらに詳しくは、生物学研究、医療診断および治療用の分光撮像（イメージング）法に関し、以下、この方法を分光生物撮像法と称する。本発明に係る方法は、空間的な構成（すなわち、分布）を検出したり、細胞および組織の自然組成、構造、器官および同位体トレーサープローブ（例えば、蛍光プローブ）のような処理コンポーネント、並びに光透過、反射、散乱および発光を利用する薬剤等を、高い空間およびスペクトル解像度で計量したりするために用いることができる。

分光計は、光を受光してその成分波長に分離（分散）させ、波長を関数とする光の強度である光スペクトルを測定するために設計された装置である。撮像（イメージング）分光計は、対象から射出される光を集めて各ピクセル（画素）のスペクトルを測定する装置である。

分光学は、化学成分のスペクトル特性に基づいて材料およびプロセスを特徴付けるために、科学および産業分野において何十年も用いられてきている周知の分析ツールである。分光学の物理的原理は、光と物質との相互作用である。伝統的に、分光学は、サンプルからの射出光、透過光、散乱光および反射光の強度を、波長の関数として、高いスペクトル解像度で、測定するものであるが、空間的な情報は有していない。

一方、高い解像度の分光学と高い解像度の撮像法（すなわち、空間情報）との合成である分光撮像（スペクトル撮像）法は、生物サンプルの

解析には用いられていない。現在の所で最も近いものとしては、限られたスペクトル情報のみを提供しつつ生物サンプルから高い空間解像度の情報を得る物があるだけであり、このようなものの例として、一つもしくはいくつかの独立したバンドパスフィルターを用いて高い空間解像度の撮像を行うものがある（Andersson-Engels等による「Proceedings of SPIE-Bioimaging and Two-Dimensional Spe

ctroscopy, 1205, pp. 179-189 (1990) 参照)。また、サンプルのいくつかの点もしくはサンプル全体の平均に限って高い空間的な解像度（例えば、全スペクトル）を得るものもある（Alfano等による米国特許第4,930,516号参照）。

以下に詳細に説明するように、分光学と撮像法とを組み合わせることは、様々な生物学的研究および医学的用途に有用である。一例を挙げれば、蛍光プローブで分類（トレース）された後において、特定の細胞組成（例えば、蛋白質、核酸配列）の検出がある。このように分光撮像法は、一回の測定でいくつかの蛍光体を特定し同時にその分布を特定するために用いることができる。実際、分光撮像法に固有の高い解像度は、重なり合うスペクトル領域を有した蛍光プローブ（もしくはその他の化学成分）を分類するのに適している。同様に、分光撮像法は、像のどの位置であっても、サンプルの環境的な不均一性（例えば、pH等）により生じる微妙なスペクトルシフトの検出も可能である。

概念上は、分光生物撮像システムは、（1）計測システムと、（2）解析ソフトウェアとからなる。計測システムは、光学および電子工学の全てを有し、サンプルの照明態様（例えば、光源の選定）、測定モード（蛍光発光もしくは透過）から、測定結果から所望の結果を抽出するのに最適な校正までを含む。解析ソフトウェアは、重要な結果を有意義な方法で解析し且つ表示するために必要な全てのソフトウェアおよび数学的なアルゴリズムを含む。

分光撮像法は、スペクトル吸収特性を識別して、地球および他の惑星の内部研究を遠隔検査する分野において、何十年にわたって用いられてきている。しかしながら、遠隔検査式の分光撮像システム（例えば、ランドサット、AVIRIS）は、コストが高く、大型且つ複雑な構成であるため、その用途は航空および衛星用に限定されている（MaymonおよびNeeck(1988)による「Proceedings of SPIE-Recent Advances in Sensors, Radiometry and Data Processing for Remote Sensing」, 924, pp. 10-22; Dozier(1988)による「Proceedings of SPIE-Recent Advances in Sensors, Radiometry and Data Processing for Remote Sensing, 924, pp. 23-30等を参照されたい）。

分光生物撮像システムと見なされる三つの基本的なタイプのスペクトル分散法

がある。それは (i) スペクトル格子法、(ii) スペクトルフィルター法および (iii) 光学干渉分光法である。後述するように、光学干渉分光法は本発明の方法を行うのに最適である。

例えば、DILORシステム (Valisa等(1995年9月) によるthe SPIE Conference European Medical Optics Week, BIOS Europe' 95, スペイン バルセロナでの発表参照) のように、スリットタイプの撮像分光計として良く知られている格子分光 (すなわち、モノクロメーター) に基づくシステムにおいては、CCDアレイ検出器の一つの軸 (空間軸) のみが実際のイメージデータを提供し、第2軸 (スペクトル軸) は、波長の関数として格子によって分散される光の強度をサンプリングするために用いられる。このシステムはまた第1の焦点平面にスリットを有し、どの時間においても視界をピクセル線に限定している。このため、この方法では、入力ビームをCCDのスペクトル軸に平行な方向に走査、すなわち、ライン走査して初めて全体像を得ることができる。全ての計測が完了する前には二次元イメージを得ることができないため、測定前に、

計測領域内で所望の領域を選択したり、システム焦点を最適化したり、露出時間を最適化したりすることはできない。格子分光に基づくスペクトルイメージは遠隔計測用途では一般的に用いられている。これは、地球の上を飛行する航空機 (もしくは衛星) は自然なライン走査機構システムを有するからである。

スリットタイプ撮像分光計は、計器の前面側光学系により全ピクセルに同時に光を集めたとしても、一つのフレーム上のピクセルで測定される時間は同時ではないという大きな欠点を有する。このため、所定のS/N比で必要な情報を得るには比較的長い計測時間が必要であり、逆に所定時間の測定ではS/N比 (感度) はそれだけ低くなる。さらに、スリットタイプの撮像分光器は、全画面についての必要情報を集めるにはライン走査が必要であるため、測定結果精度は低下しやすい。

フィルターを用いるスペクトル分散法はさらに、独立フィルターとチューナブルフィルターとに分類できる。これらのタイプの撮像分光器においては、スペクトルイメージは、光路内に狭いバンドパスフィルターを挿入して、異なる波長毎

に、且つ各時間毎に、両面内の全ピクセルに照射される光にフィルターをかけて画像を得たり、AOTFもしくはLCTF（下記参照）を用いて電氣的に波長域を走査して得られる。フィルターベーススペクトル分散法を用いても、上述した格子を用いてスリットタイプの撮像分光計と同様に、各時間においては照射光の大部分は用いられない。実際、測定される波長以外の光子は全てはねられてCCDに到達しないので、特定の波長の全体像が測定できるだけである。

音響-光学チューナブルフィルター（AOTFs）および液晶チューナブルフィルター（LCTFs）のようなチューナブルフィルターは可動部材を有しておらず、これらが装着される装置のスペクトルレンジにおける任意の波長にチューンすることができる。分光撮像分散法として

チューナブルフィルターを用いる利点の一つは、任意に波長を選択できること、すなわち、フィルターホイールを用いることなく、任意の順序で多くの波長での強度分布イメージを測定できる能力である。しかしながら、AOTFsおよびLCTFsは、(i) スペクトルレンジが限られ（例えば、 $\lambda_{\max} = 2 \lambda_{\min}$ ）、このレンジ外の光は全て遮断されなければならない、(ii) 温度に敏感である、(iii) 透過率が低い、(iv) 偏光性がある、(v) AOTFsの場合には波長走査中にイメージシフト効果があるという欠点を有する。

このようなフィルターおよびチューナブルフィルターベースのシステムは全て、スペクトル解像度に限界があり、感度が低く、簡便性に欠け、データの変換および表示のためのソフトウェアアルゴリズムが複雑であるため、どのような用途においても分光撮像としては長年にわたって継続して且つ広範囲にわたって用いられるものではなかった。上述のように、本発明の発明者は、光干渉型撮像分光計およびここで提案されているような解析および表示アルゴリズムを用い、生体臨床医学に適用できる高解像度の撮像系と組み合わせられた高解像度の分光学について述べた文献を全く発見できなかった。但し、上述したように、高解像度の撮像系と組み合わせられた低解像度および低感度の分光計や、サンプルの一方もしくは数カ所についての高解像度の分光計についてある程度研究した文献や、特許は見つかった。例えば、(1) 細胞遺伝研究に関して：Ried (Jan. 1994) Fluores

zenz in situ Hybridisierung in dergenetischen diagnostik, Faculty of the
oretical medicine, Ruprecht-Karls University Heidelberg、(2) 細胞内の
薬剤分布に関して: Manfait and Charonov (1995) Fluorescence spectral imag
ing: State of the art and perspectives." AFC CYTOMETRIE' 95, Reims, Fran
ce, Sep. 27th-29th, 1995 において発表、(3) 組織ガン検診に関して: Alfano
et
al. による米国特許第4,930,516号; Andersson-Engels (1990) Proceedings of
SPIE, Bio-imaging and Two-Dimensional Spectroscopy, 1205, pp.179-189、お
よび Pitris et al. (1995), Paper presented at European Biomedical Optics
Week by SPIE, 12-16 September 1995, Barcelona Spain、(4) 細胞レベルに
おけるガンの特性表示に関して: Wied et al. (1981) Computer Discriminati
on of Ectocervical Cells, The International Academy of Cytology Analytic
al and Quantitative Cytology, Vol.3, p.225、(5) 眼科学に関して: Delor
i (1995) Appl.Optics Vol.27,1113, 1988 および Appl.Optics, Vol.28, 1061,
並びにスリットカメラおよび蛍光血管造影に関するその他の文献、例えば、Delo
ri et al. (1980) Vision Research, Vol.20, 1099 等がある。

しかしながら、これら文献および特許は、使用されるハードウェアという観点
において本発明とは異なる。このハードウェアとは、高い空間およびスペクトル
解像度が得られる組み合わせ、結果を解析し表示するために用いられるアルゴリ
ズム、そして最後に、細胞および／もしくは組織レベルにおいて診察医、研究者
もしくは外科医に与える化学生理および病理的な兆候等である。

上記の点で優れている画像のスペクトル解析用の方法および装置が、1995
年2月21日出願のC a b i b等による米国特許出願第08/392,019号に開示され
ている。なお、この特許出願は、画像のスペクトル解析用の装置および方法を提
供するために、全て本件出願の内容として取り込まれる。この装置および方法に
よれば、画像からの射出光を集めて得られる全情報を有効に利用して、従来のス
リットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターに比べて、フ
レーム時間を大きく低減しさらに／もしくはS/N比を大きく向上させ、さらに

ライン走査を含まない。本発明によれば、各ピクセルのスペクトル強度を求め、
対

象の光学イメージを解析する方法が提供される。このため、対象からの射出光を集め、各ピクセルからの射出光のスペクトル強度をリニアに集めた所定セットに対応して、調整された光を出力させる干渉計を通過させ、この干渉計からの光を検出器アレイの上に集め、全ピクセルについて独立して且つ同時に光干渉計において作られた光路差 (OPD) を走査検出し、検出器アレイの出力 (全ピクセルそれぞれの干渉像) を処理して各ピクセル毎のスペクトル強度を求める。この方法は様々なタイプの干渉計を用いて実行され、この場合、干渉計全体、干渉計内の一要素もしくは入射光の入射角を変動させてOPDが変えられて干渉像が作られる。これら全ての場合において、スキャナーが干渉計の一回の走査を完了すると、画面に全ピクセルの干渉像が完成する。上記の特性を有した装置は、上述のように干渉計を用いていることにより、従来のスリットタイプもしくはフィルタータイプの画像スペクトルメーターと異なり、このため、集めたエネルギーを小孔もしくはスリットに限定したり、干渉もしくはチューナブルフィルターにより狭い波長域に限定したりすることがなく、その結果、システム全体としてのスループットが向上する。このように干渉計ベースの装置は、解析すべき対象からの射出光から得られる全情報を有効に利用でき、測定時間を大幅に低減させさらに／もしくはS/N比 (すなわち、感度) を大幅に向上させる。例えば、John B. Wellman (1987) Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing, SPIE Proceedings, Vol.750, p.140 に述べられている "whisk broom" を考えてみる。ここで、 n をリニアアレイにおける検出器の数とし、 $m \times m$ をフレーム内のピクセル数とし、 T をフレーム時間とする。一つのフレームにおける各ピクセルの使用時間を検出器アレイ全部について合計した時間は、 nT/m^2 である。米国特許出願第08/392,019号に開示の発明に係る方法の場合には、同一サイズのア

レイで同一のフレームレートを用いれば、特定のピクセルについて全検出器の合

計使用時間は、 nT/m^2 である。しかしながら、従来の格子法においては各時間において全検出器によって見られるエネルギーは、波長解像度がそのレンジの $1/n$ であるので、全エネルギーの $1/n$ のオーダーとなる。これに対して、米国特許出願第08/392,019号に開示の発明に係る方法の場合には、モジュレーティング関数がラージOPDレンジについての平均が50%となる振動関数（例えば、ファブリペロ：Fabry-Perotを有した低フィネスエアリー関数（low finesse Airy function）のようなシヌソイド（Michelson）もしくはこれと同様の周期的な関数）であるので、1のオーダーとなる。干渉学の教科書（例えば、Chamberslain (1979) The principles of interferometric spectroscopy, John Wiley and Sons, pp.16-18 and p.263 参照）に述べられている Fellgett 効果（もしくは多重効果）の標準処理に基づけば、本発明に係る装置は、ノイズレベルが信号からは独立しているというノイズ制限条件（システムもしくはバックグラウンドノイズが限定される条件）においては、 $n^{0.5}$ のファクターで改善され、且つ、前記制限が信号光子ノイズにより生じる場合での狭いピーク波長におけるスペクトルレンジにおいて、特定の波長の信号に対する平均信号の比の平方根で改善されるようなS/N比の測定を有するということを示すことができる。このように、米国特許出願第08/392,019号に開示の発明によれば、スペクトルの再構築に必要な全情報を得るために、必要OPDsの全てが画像の全ピクセルについて同時に走査され、これにより、画像情報とともにスペクトル情報が同時に集められる。この発明は、遠隔検査のための望遠鏡、実験室での解析用の顕微鏡、産業上でのモニター用の光ファイバーおよび医学的な撮像、診断、治療等のような様々な光学的な構成として用いられる。

分光生物撮像システムは、潜在的に、画像中での空間分布および組成を注目すべき化学成分間で、微妙なスペクトル差が存在する適用例に有用である。この計測は、本質的には、特許出願第08/392,019号に述べられているシステムに付属のいずれかの光学システムを用いて行われ、このような光学システムとしては、例えば、直立もしくは反転型顕微鏡、蛍光顕微鏡、マクロレンズ、内視鏡および眼底カメラがある。さらに、光透過（明視野および暗視野）、自己蛍光および投与

プローブの蛍光等を含む標準的な実験方法を用いることができる。

蛍光計測は、出力スペクトルがシステム感度のスペクトルレンジ内にあると仮定して、標準フィルターキューブ（バリアフィルター、励起フィルターおよびダイクロイックミラーからなる）もしくは特殊用途用のカスタマイズされたフィルターキューブを用いて行うことができる。分光生物撮像法は、暗視野および位相差のような標準空間フィルター法とともに、さらには偏光顕微鏡検査法とともに用いることができる。このような方法を用いるときでのスペクトル情報の効果は、計測スペクトル像を正しく変換することである。

光透過および蛍光顕微鏡検査法において分光生物撮像システム用の実験的な方法および特殊な用途はたくさんある。このような方法および用途としては、これに限られるものではないが次のような物がある。(1) 光透過顕微鏡検査—着色組織サンプルの計測、(2) 蛍光顕微鏡検査：(i) 多重蛍光搬送体のスペクトル認識、(ii) 細胞レベル以下の区画（例えば、pH、 Ca^{++} イオン集中）におけるミクロ的な環境変化および染料特性の検出、(iii) 自然色素（例えば、葉緑素）からの自己蛍光の計測、および(iv) 蛍光共鳴エネルギートランスファー（FRET）。これ以外の可能性のある用例としては、(1) 時間分解スペクトル画像（適切な外部トリガーを有した格子強化CCDを用いて得られる）、

(2) ラマン散乱計測、がある。

Human Genome Project(HGP)の主たる利点の一つは、病原遺伝子およびその他の染色体領域および構造のための多数の核酸プローブの分離であった。このことは、展開し得るテストの数およびタイプがこれらプローブに依存しているため、DNA診断における興味を呼び起こした。近年においては、fluorescent in situ hybridization (FISH)において特に関心もたれており、この(FISH)とは、試験した染色体領域を補う特定の核酸プローブに共役な蛍光部分でマークを行うプロセスであり、これに続いて蛍光顕微鏡検査により蛍光部分が可視化される。

基本的な実験室内において伝統的にFISHが用いられてきているが、これと並行して、臨床分野においてもFISH技術が用いられるようになってきている。FISHは細胞遺伝学への最も進んだアプローチであると考えられており、FISHから得られ

る染色体に関する情報量は、DNAハンドリング法によって標準の核型から得られる情報よりずっと多い。さらに、クラシカルな（中期の）細胞遺伝学に比べて、休止期の細胞遺伝学のような技術を用いれば、診断情報をずっと速く得ることができる。

本発明によればFISH撮像法が提供され、これによれば、顕微鏡の視野内の全ピクセルから蛍光スペクトルを同時に得ることができ、一回の実験で多くのプローブの位置を検出することができる。染色体の特定プローブを用いることができるとともに新規なラベリング法を用いることにより、この方法は、核染色体を異なる色（すなわち、人間の核型用の24の異なる色）に着色することによりFISH核型を作り出すことができる。これにより非常に高いサンプルスループットが達成でき、本質的にプローブの数に制限されない解析が可能となる。

本発明の別の目的は、生体コンポーネントから白色光、紫外光もしくはレーザー励起発光スペクトルの量的な分布マップを得ること（例えば、

網膜血管における酸化および脱酸素ヘモグロビンおよび／もしくは網膜におけるメラニン色素沈着レベル）や、健康なもしくは他の病気の組織もしくは細胞からガン部を区別することである。このような励起発光分光学によって得られる信号は、組織を異なるコンポーネントに分類するために用いることができる。この方法によればさらに、蛋白質、炭水化物、 NAD^+ および NADH 、コラーゲン、エラスチンおよびフラビン、および細胞および／または組織内の種々の添加変形媒介物を識別したり、これらの空間的な配置マップを作成可能である。所定の波長の光を用いるとともに種々のアルゴリズムにより解析することにより、組織（もしくは細胞）のアルカリ度もしくは酸性度、組織内における腫瘍の存在のみならず出血等を検知したり、その分布マップを得たり、特性付けを行ったりすることができる。検出感度は、種々の蛍光タグを用いて高めることができる。これらタグは、細胞および／もしくは組織レベルにおいて悪性度を判定するために用いることができ、このため、この方法はガン診断および終末治療の分野で最も急速に発展している。生体サンプルからの発光光を検出するための実験室的なシステムは世界中で様々なものが知られている。今日、医学分野でのキーとなるものは

、これら診療検知システムから得られる信号および画像をどのように解析するか
ということであり、本発明はこの点に関するものである。

このように医療診断および治療用並びに上述のような制限のない生物学的研究
用の分光生物撮像方法の必要性が広く認識されており、このような方法を有する
ことは非常に利点が多く、この方法によれば、組織の空間構成を検出したり、細
胞および組織構成や治療プローブおよび薬剤の定量および有意義な表示を行っ
たりすることを、光透過、反射、散乱および蛍光発光法を用いて行うことができる
。

発明の概要

本発明によれば、生物学的な研究、医学診断および治療用の分光撮像方法を得
ることができ、この方法を以下においては分光生物撮像方法と称する。本発明に
係る方法は、空間的な構成（すなわち、分布）を検出したり、細胞および組織の
自然組成、構造、器官および同位体トレーサープローブ（例えば、蛍光プローブ
）のような処理コンポーネント、並びに光透過、反射、散乱および発光を利用す
る薬剤等を、高い空間およびスペクトル解像度で計量したりするために用いるこ
とができる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、分光生物撮像方法
は、（a）分光撮像されるべきサンプルを調製する工程、（b）そのサンプルを
光学装置を通して観察する工程、この光学装置は撮像分光計に光学結合されてお
り、光学装置および撮像分光計は、（i）コリメート光学要素を用いてサンプル
の全ピクセルから入射光を同時に収集し、（ii）コリメートされた入射光を多
数の要素を有する干渉計系に通し、まず、光が干渉計内部で異なった方向に進行
する2つのコヒーレント光線に分割され、次いで2つのコヒーレント光線が再結
合されて互いに干渉して出射光線が形成されるようにし、（iii）出射光線を
、検出器要素の2次元アレーを有する検出器上に出射光線を収束させる収束光学
系に通し、各時点で検出器要素の各々がサンプルの1つの、全測定期間を通じて
常に同一のピクセルであり、サンプルの実像は検出器アレー面上で固定され、測
定中のあらゆる時点で像は可視かつ識別可能であり、各検出器要素は、異なる波

長でピクセルから発せられる光の強度の特定の一次結合である信号を生成するようにし、この一次結合は瞬時光路差の関数とし、(i v) 干渉計系の少なくとも1つの要素を回転し、干渉計系によって生成された2つのコヒーレント光線の間の光路差がサンプルの全ピクセルについて同時に走査されるようにし、(v) 記録装

置を用いて各検出器要素の信号を時間の関数として記録し、データの第1のキューブ(立方体)を形成することによってサンプルの各ピクセルのスペクトルを得るためのものである、および(c) 数値アルゴリズムを用いて第1のキューブを解釈する工程を含む。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、この方法はさらに(d) 解釈されたデータのキューブをマップする工程を含んでもよい。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記光学装置は、顕微鏡、カメラレンズ、内視鏡、眼底カメラおよび眼底鏡からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記顕微鏡は、反射顕微鏡、透過顕微鏡、蛍光顕微鏡、直立(縦型)顕微鏡、倒立顕微鏡、暗視野顕微鏡、コンフォーカル顕微鏡、定在波コンフォーカル顕微鏡および反射コントラスト顕微鏡からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記平行光は、サンプルからの透過光、サンプルからの反射光、サンプルからの散乱光およびサンプルからの発光光からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、サンプルからの前記発光光は、投与プローブ蛍光、投与プローブ励起蛍光および自己蛍光のグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、光源から生成される前記光は、レーザー、白色光、フィルター透過光、紫外光および短波長レンジの光のグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記光は複数の光

源から生成され、これら光源は同時にもしくは順次作動される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記二次元アレイは、ビデオレート CCD、冷却高ダイナミックレンジ CCD、増感 DDC もしくは時間ゲート増感 CCD のような CCD からなる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、サンプルは細胞、組織および微生物からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞および組織は人体から採取される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞は、例えば、Pap 染色により集められた細胞、血液細胞、胎児細胞、悪性腫の疑いのある細胞、分裂休止期の細胞、有糸分裂中細胞および還元分裂中細胞である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記組織は、網膜、網膜血管、腫瘍、皮膚、角膜、髪、肺、胃、腸、膀胱、結腸、前立腺、頸部、動脈、静脈および心臓からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルが網膜であり、前記方法が、網膜血管における酸化および脱酸化ヘモグロビンの検出および/もしくは網膜のメラニン色素沈着レベルの検出用である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルが細胞、組織の一部および微生物からなるグループから選択され、前記光がプローブにより励起され、このプローブは特定の細胞成分に結合され、前記方法は細胞成分の存在もしくはそのレベルの検出用である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記プローブは共役蛍光部分を含み、前記励起が蛍光部分の蛍光発光である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記プローブがさらに核酸分子を含み、前記方法がこの核酸分子と交配する細胞

核酸（デオキシリボ核酸および/もしくはリボ核酸）の存在もしくはそのレベルの検出用である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記プローブが抗体を含み、前記方法が、この抗体により認識される細胞蛋白質の存在もしくはそのレベル検出用である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記蛍光部分が例えば、SpectrumOrange™, SpectrumGreen™, Aqua, Texas-Red, FITC, ローダミン、フルオレスセイン、カスケードブルーおよびこれらの組み合わせである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが、サンプルの各ピクセルのスペクトルのポイントオペレーション解析である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記ポイントオペレーション解析が、サンプルにおける各ピクセルのスペクトルを変形関数に基づいてスカラーマッピングすることを含む。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記ポイントオペレーション解析が、サンプルにおける各ピクセルのスペクトルを変形関数に基づいて別のスペクトルにマッピングすることを含む。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが形態学解析であり、この形態学解析が類似マッピングのようなスペクトル解析に続いて行われる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが類似マッピング解析であり、これによりサンプルの各ピクセルにおける参照スペクトルからのスペクトル差を計算する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは疑似カラーイメージを作りだし、

ここでは明るいピクセルが小さなスペクトル差に対応し、暗いピクセルが大きなスペクトル差に対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記類似マッピング解析がグレイレベルもしくは疑似カラーイメージを作りだし、ここでは明るいピクセルが大きなスペクトル差に対応し、暗いピクセルが小さなスペクトル差に

対応する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記スペクトル差が、各ピクセルのスペクトルと参照スペクトルとの差の絶対値を所定波長レンジにおいて積分して定義されるスカラーである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが分類マッピング解析であり、これにより、各ピクセルのスペクトルにおけるいくつかの参照スペクトルからのスペクトル差を計算する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記分類マッピング解析が疑似カラーイメージを作り出し、このイメージにおいていくつかの参照スペクトルの一つに対して所定最大スペクトル差を有する一群のピクセルが所定疑似カラーにより着色される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記スペクトル差が、各ピクセルのスペクトルと前記いくつかの参照スペクトルの一つとの差の絶対値を所定波長レンジにおいて積分して定義されるスカラーである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが主要コンポーネント解析である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記主要コンポーネント解析が、(a) 全測定ピクセルおよび波長、なお、複数波長が用いられるときには励起光源の波長を含む、の共変マトリクスを

構築し、(b) この共変マトリクスを対角化するとともに全直交スペクトルベースエレメントを見つけだし、(c) どのベースエレメントがサンプルの所定特徴を有するかを探し出すようになっている。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが一次結合解析である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析が、前記第1のスペクトルキューブデータおよび前記第2のスペクトルキューブデータに属する一対の対応ピクセルの対応波長間に算術関数を適用して、第3スペクトルキューブデータを求めるようになっている。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、二つのスペクトルキューブデータの平均演算、時間変化追跡およびスペクトル正規化からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析は、算術関数によって各ピクセルのスペクトル波長の全てに所定スカラーを与えるものであり、この算術関数は加算、減算、乗算、除算およびこれらの組み合わせからなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析はバックグラウンドの除去に用いられ、サンプルのバックグラウンド部に位置するピクセルのスペクトルがサンプルのピクセルのスペクトルから引き去られる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記一次結合解析が校正処理に用いられ、サンプル観察前に測定されたスペクトルがサンプルのピクセルのスペクトルを除するために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムが光密度解析である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記光密度解析が光密度マップである変換イメージを得るためのものである。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムは予め設定された波長レンジを用いてRGBカラーイメージを計算する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムはピクセルの各スペクトル用の二つの異なる波長間の比を算出する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記数学的アルゴリズムはピクセルの各スペクトル用の二つの異なる波長間の比を算出し、このように算出された比に応じて、各ピクセルを明色もしくは暗色の人工色で着色する。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンプルに投与された多重蛍光搬送体のスペクトル特定を行うために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サン

ルにおける局所的な電位、pHレベルおよび細胞間のイオン集中などのようなミクロ的な環境変化を検出するために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンプル内の葉緑素、ポルフィリンおよび／もしくは細胞質蛋白のような自然成分からの自己蛍光を測定するために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、生物学研究、薬品開発産業、病理学における細胞および組織分類、血液学、尿中のバクテリアの存在解析、染色体中での遺伝子識別およびマッピング、遺伝子病診断、細胞器官解剖学および生理学、細胞核におけるクロマチン分配および凝縮、細胞質器官および成分マッピング、核皮膜

マッピング、皮膚癌のマッピング、黒色腫およびほくろの選別、ポートワイン母斑、および光力学的治療の前、間および後の皮膚画像作成からなる用途グループから選択される用途のために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞質成分は NAD^+ 、 NADH 、フラビンおよびチトクロームからなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は、サンプルにおける少なくとも二つの蛍光間の空間分離を決定する蛍光共鳴エネルギー移転を測定するために用いられるが、少なくとも一つの蛍光搬送体はサンプルに外部から投与される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサンプルにおける細胞および細胞レベル以下の詳細の認識およびマッピングを行うために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルは Romanowsky-Giemsa 着色法、Haematoxylin-Eosin 着色法および May-Grunwald-Giemsa 着色法からなるグループから選択された方法により着色される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記細胞レベル以

下の詳細は、核におけるクロマチン組織のタイプであり、このタイプは異質染色質および真正染色質からなるグループから選択される。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、前記サンプルが細胞、組織および微生物からなるグループから選択され、前記方法はサンプルにおける生命プロセスを時間を関数としてモニターするために用いられる。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は

蛍光交配法であり、この方法は、(a) 少なくとも一つの蛍光染料を用いて少なくとも一つの核酸分子を特定し、少なくとも一つの蛍光追跡核酸プローブを得るステップと、(b) 生物サンプルの細胞核酸と前記プローブとを交配させるステップとを有し、さらに、これらステップに変えてもしくはこれらステップに追加して(a) 少なくとも一つの核酸プローブと生物サンプルの細胞核酸とを交配させるステップと、(b) 前記少なくとも一つのプローブを少なくとも一つの蛍光染料により特定するステップとを有し、これらに続いて次のステップが行われる。(c) 蛍光顕微鏡を通して生物サンプルを観察するステップ、この蛍光顕微鏡は撮像分光計に光学的に繋がり、これら蛍光顕微鏡および撮像分光計は生物サンプルの各ピクセルのスペクトルを次のステップに基づいて得る。(i) 平行光学系を用いて生物サンプルの全ピクセルからの射出光を同時に集光するステップと、(ii) この射出平行光をたくさんのエレメントを有する干渉計システムを通過させるステップと、なお、これにより、まず干渉計内を異なる方向に流れる二つの干渉ビームに分離され、そして、これら二つの干渉ビームが互いに干渉して再結合され励起ビームが作られる、(iii) この励起ビームを合焦光学システムを通過させて二次元配列の検出エレメントを有する検出器に合焦させるステップと、なお、これにより、各瞬間において、各検出エレメントがイメージの一部であり、測定の全期間において生物サンプルにおける同一ピクセルとなり、これにより生物サンプルの実際のイメージが検出器アレイの面上で静止され、測定中いつでもこのイメージを観察でき且つ認識でき、このため、各検出エレメントが異なる波長におけるピクセルから射出される光強度の一次結合である信号を発生し、なお、一次結合は瞬間的な光路差の関数であり、(iv) 干渉計システムの一つもし

くは複数の要素を回転させるステップと、なおこれにより、この干渉計システムによって作られた

二つの干渉ビーム間の光路差が、生物サンプルの全ピクセルについて同時に走査され、(v) 第1スペクトルキューブデータを形成するために記録装置を用いて時間の関数として各検出エレメントの信号を記録するステップとからなる。最後に、(d) 数学的アルゴリズムを用いて前記第1スペクトルキューブデータを変換するステップを有し、この数学的アルゴリズムは背景削除および/もしくは分類マッピングシステム用の一次結合である。

後述の本発明に係る好ましい実施例における特徴によれば、本方法は細胞分類方法であり、次のステップからなる。(a) 解析用の細胞スミア(標本)を準備するステップ。(b) 透過顕微鏡により前記細胞スミアを観察するステップ、なお、透過顕微鏡は撮像分光計と光学的に繋がり、透過顕微鏡および分光計は細胞スミアの各ピクセルのスペクトルを次のステップに基づいて得る。(i) 平行光学系を用いて細胞スミアの全ピクセルからの射出光を同時に集光するステップと、(ii) この射出平行光をたくさんのエレメントを有する干渉計システムを通過させるステップと、なお、これにより、まず干渉計内を異なる方向に流れる二つの干渉ビームに分離され、そして、これら二つの干渉ビームが互いに干渉して再結合され励起ビームが作られる、(iii) この励起ビームを合焦光学システムを通過させて二次元配列の検出エレメントを有する検出器に合焦させるステップと、なお、これにより、各瞬間において、各検出エレメントがイメージの一部であり、測定の全期間において細胞スミアにおける同一ピクセルとなり、これにより細胞スミアの実際のイメージが検出器アレイの面上で静止され、測定中いつでもこのイメージを観察でき且つ認識でき、このため、各検出エレメントが異なる波長におけるピクセルから射出される光強度の一次結合である信号を発生し、なお、一次結合は瞬間的な光路差の関数であり、(iv) 干渉計システムの一つも

しくは複数の要素を回転させるステップと、なおこれにより、この干渉計システムによって作られた二つの干渉ビーム間の光路差が、細胞スミアの全ピクセルに

ついて同時に走査され、(v) 第 1 スペクトルキューブデータを形成するために記録装置を用いて時間の関数として各検出エレメントの信号を記録するステップとからなる。最後に、(c) 数学的アルゴリズムを用いて前記第 1 スペクトルキューブデータを変換するステップを有する。

本発明によれば、サンプルの各ポイント（すなわち、ピクセル）から独立して且つ同時に集められたデータの分光分析を可能としているので、従来のものが有する欠点を十分に克服できる。この方法によれば、サンプルの位置を関数とした材料および分子タイプおよび集中度の情報のみならず、従来の形態学解析（例えば、Ruteberg による米国特許第 4,965,727 号参照）による従来のイメージ情報が得られる。このため、本発明は、光透過、反射、散乱および蛍光法を用いて、高い空間およびスペクトル解像度で、細胞および組織コンポーネント、構造、細胞器官、遺伝物質、投与蛍光追跡プローブの空間組織および量の検出を行うことのみならず、細胞および組織内での投与薬剤の分布検出を行うことができる。本発明のさらなる効果は、分光データの変換が非常にシンプルであることである。本発明のもう一つの効果は、フィルター、格子およびその他の散乱技術による既知の Fellgett もしくは フーリエ変換分光学の多重効果であり、これにより、スペクトル計測において高い S/N 比での表現が可能である。本発明の肝要な部分は多数の数学的アルゴリズムであり、このため、データを意味ある方法で変換もしくは表示するためにコンピュータソフトウェアが必須である。

図面の簡単な説明

以下に本発明について添付の図面を参照して例示的に説明するが、ここで、

図 1 は、従来（従来技術に係る）のスリットタイプ撮像分光計を示す。

図 2 は、米国特許出願第 08/392,019 号に従って構成された従来技術に係る撮像分光計の主要構成を示すブロック図である。

図 3 は、米国特許出願第 08/392,019 号に従って構成された撮像分光計に用いられる非可動タイプの干渉計、すなわち、サグナック（Sagnac）干渉計を示す。

図 4 は、選択スペクトルレンジを強調するための疑似 RGB（赤、緑および青）色の定義を示す。各疑似色の強度は、曲線の一つを掛けた後、曲線の下側の面

積を積分して計算される。

図5 (a) は、オリンパス倒立顕微鏡 (IMT2) に添付のSpectraCube™ ベースの分光生物撮像システムを用いて得られた、プロピディウム(propidium)ヨウ素で着色した細胞の蛍光スペクトルイメージを示し、図5 (b) は、本発明に方法を用いて図5 (a) に示す画像の三つの独立ピクセルからの蛍光発光スペクトルのプロットである。

図6 (a) は、有糸分裂中の細胞のRGB疑似色イメージを示し、分裂細胞はアクリジンオレンジで着色されている。図6 (b) は、細胞のスペクトルイメージを差くするために測定された二つのスペクトルのプロットであり、細胞質領域からの第1のスペクトル (M印) はアクリジンオレンジの単一形状に特徴があり、核領域からの第2のスペクトル (D印) はアクリジンオレンジの三成分形状に特徴がある。図6 (c) は、参照スペクトルとしてアクリジンオレンジの二成分形状のスペクトルを用いて同様なマッピング解析を行った結果を表す。図6 (d) は、参照スペクトルとしてアクリジンオレンジの単一形状のスペクトルを用いて同様なマッピング解析を行った結果を表す。

図7 (a) は、*Oedogonium* sp. alga からのトータル発光蛍光を示し、図7 (b) は、参照スペクトルとして図7 (e) のスペクトルAを用いた同様のマッピング解析結果であり、図7 (c) は、図7 (a) における像の薄い赤色蛍光スペクトルを用いた同様のマッピング解析結果であり、図7 (d) は、参照スペクトルとして図7 (e) のスペクトルBを用いて同様のマッピング解析結果であり、図7 (e) は図7 (a) ~ (d) に示す試験片の四つの異なるピクセルからの蛍光スペクトルを示す。

図8 (a) は、血液細胞を着色するため May-Grunwald-Giemsa 法により着色された血漿細胞を示し、図8 (b) は、図8 (a) の細胞の異なる細胞レベル以下の場所 (A~E) を示す。

図9 (a) は、図8 (b) の矢印で示す五つのピクセルからの透過光スペクトルを示し、図9 (b) は、図8 (a) および (b) の細胞の外側で記録された射出光と比較して計算された図9 (a) のスペクトルに対応する吸収スペクトルを

示す。

図10は、図9(a)に示すスペクトルA, B, CおよびD/Eがそれぞれ参照スペクトルとして用いられたときでの定量的な類似マッピング解析を示す。

図11(a), 11(b), 11(c)および11(d)は、図12(a)に示すゾウリムシの四つの異なる場所の蛍光ピクセルスペクトルを示し、生きているゾウリムシが蛍光顕微鏡(オリンパスBH2 R F C)に添付のSpectraCubeTMシステムによって解析された。ゾウリムシ細胞は緑色光(最大545 nmのバンドパス)により励起され、このシステムにより赤色蛍光が測定された。

図12は摂取藻類によるゾウリムシの蛍光イメージを示し、この解析により、
(a) ゾウリムシ細胞は緑色光(最大545 nmのバンドパス)

により励起され、赤色フィルター(590 nm)を通して観測された赤色蛍光を示し、(b) 図11(a)のスペクトル1に基づく類似マッピング解析により、ゾウリムシの上部に自然藻類の葉緑素の含有率の高い二つの顕著な領域が見いだされ、これはおそらく細胞咽頭及び口腔を示しており、(c) 細胞咽頭の隣にほぼ1ピクセルの空胞点(図11(a)のスペクトル2を用いたマップ)が見られ、(d) および(e) 図11(b), (c)のスペクトル4, 5を用いたマップがそれぞれ、同一区画の狭い領域に輪郭を描いて、細胞質の中央部に大きな空胞が見られ、(f) 図11(d)のスペクトル6を用いたマッピングにより、消化物が細胞から排出される細胞肛門領域が見られる。

図13は、図14に示す二匹の交尾するゾウリムシの空胞における藻類葉緑素の蛍光スペクトルである。交尾するゾウリムシの空胞の上部(1)および下部(2)の個々のピクセルスペクトルであり、スペクトル(3)は図14A~Cに示す二つの細胞の中央接触部におけるピクセルから得られた。

図14A, B, Cは、(a) 二匹の交尾するゾウリムシの空胞における藻類葉緑素の蛍光を示し、(b) 交尾するゾウリムシにおける空胞および自然葉緑素含有率の類似マッピングイメージ(図13のスペクトル2によるマップ)を示し、一つの細胞は大きな食物空胞を有し、もう一つは小さな空胞を有し、これらはそれぞれタイプIおよびタイプII細胞に対応する。(c) 図13の低強度スペクト

ル3がマッピングに用いられ、細胞の細胞質における反射赤色光を示す。

図15は葉緑素の退化ステップを示す。

図16(a)および(b)は、May-Grunwald-Giemsa 着色赤芽球細胞の五つの異なる細胞箇所(すなわち、個々のピクセル)の多重透過スペクトルおよび吸収スペクトルを示す。

図17a, 17b, 17c, 17d, 17e, 17f, 17g, 17h, 17i, 17j, 17k, 17l, 17m, 17n, 17oおよび17pは、RGB(a, e, i, m)イメージと、真正染色質(b, f, j, n)のスペクトル、異質染色質(c, g, k, o)のスペクトルから得られた類似マッピング結果と、前赤芽球(a-d)、好塩基性の正赤芽球(e-h)、初期赤芽球(i-l)および後期赤芽球(m-p)の細胞質コンポーネント(d, h, l, p)のスペクトルから得られた類似マッピング結果とを示す。

図18a, 18b, 18c, 18d, 18eおよび18fは、B-16黒色腫細胞における光感作中での包含PP蛍光の細胞サイズ以下の局所化を示す。細胞は5-ALAとともに20時間培養され、400nmの光で励起され、図19a-cのスペクトルを参照スペクトルとする類似マッピング解析を用いて赤色蛍光画像を得て解析された。

図19a, 19bおよび19cは、それぞれ図18a, 18bおよび18cに示した細胞からの4, 4および2の個々のピクセル蛍光スペクトルを示す。

図20aおよび20bは、血清富裕媒体においてPPとともに培養された黒色腫細胞における外因性PPの蛍光局所化を示し、(a)はexo-PPとともに培養された後での制御黒色腫再部位の赤色蛍光を示し、(b)は(a)と同様の細胞に1分の光照射(4 J/cm^2)を行った後での赤色蛍光分布を示す。

図21a, 21bおよび21cは図20a, 20bの細胞および暗所で5分の培養を行った後での細胞の付加イメージの単一ピクセル蛍光スペクトルを示し、

(a)は図20aに示す細胞における細胞レベル以下の場所の異なる場所(すなわち、個々のピクセル)からの五つの単一ピクセルスペクトルを示し、(b)は光照射の後での図20bの細胞から

の四つのスペクトルを示し、(c)は暗所でさらに5分間の培養を行った後での細胞レベル以下の箇所からの四つのスペクトルを示す。

図22はゾオキサンテラ蛍光マップの三つのランダムなピクセルのスペクトルグラフであり、671nmに発光ピークを有する。

図23A, 23B, 23C, 23D, 23Eおよび23Fにおいて、A, CおよびEは正規化前での三つのサンゴの多重ピクセル蛍光マップを示し、B, DおよびFは発光強度に対応して、654nmから685nmの間で、それぞれA, CおよびEの蛍光イメージに示されたトランスアクトに沿って、正規化された三次元図であり、AおよびBは*Favites halicora*で、CおよびDは*Goniastrea retiformis*であり、EおよびFは*Millepora dichotoma*である。

図24a, 24bおよび24cは、共生体(a)*Favites halicora*, (b)*Goniastrea retiformis*, (c)*Millepora dichotoma*に隣接するピクセルに対する蛍光値の回帰曲線を示し、いくつかの放射トランスアクトに沿った同一距離に見られるピクセルから測定した平均値が示され、第1ポイントと第5ポイントとの距離が2.4mmであり、縦線が±S.E.であり、破線が回帰曲線であり、回帰結果は*Favites halicora*が $r^2=0.905$ であり、*Goniastrea retiformis*が $r^2=0.066$ であり、*Millepora dichotoma*が $r^2=0.062$ である。

図25a, 25bおよび25cは、三つのサンゴ(a)*Favites halicora*, (b)*Goniastrea retiformis*, (c)*Millepora dichotoma*のスペクトル類似マップを示し、全ピクセルが高蛍光を有する選択ピクセルと比較されている。類似性がグレイスケールで示され、明るいピクセルが高い類似性を有し、暗いピクセルは低い類似性を有する。

図26a, 26bおよび26cは、Texas-Red and Rhodamineに添付の二つの異なるプローブを用いて行われた休止期FISHを示し、(a)

は顕微鏡を介して観察されるオリジナルイメージを示し、(b)は本発明に係る方法によって測定されて処理された後の同一サンプルイメージを示し、(c)は、Texas-Red and Rhodamine 蛍光搬送体による蛍光スペクトルを示す。

図27a、27bおよび27cは、異なる蛍光搬送体により区別された六つの異なるプローブを用いて行われた休止期FISHを示し、(a)は顕微鏡を介して観察されるオリジナルイメージで、細胞はDAPIにより着色されており、(b)は本発明に係る方法によって測定されて処理された後の同一サンプルイメージを示し、(c)は六つの蛍光搬送体の蛍光スペクトルである。

図28は、Papanicolaouテスト（すなわち、Pap着色）で一般的に用いられるように Haematoxylin-Eosin 着色細胞のRGBイメージを示し、Aマークが付けられた細胞がHPV(human Papilloma virus)癌性頸部細胞であり、Bマークが付けられた細胞が正常頸部細胞であり、C、DおよびEは多形核細胞、鱗状細胞の核およびAマーク細胞の細胞質を示す。

図29は、固有値 μ_i が20の異なる主要コンポーネント、すなわち、波長レンジ($i = 1, \dots, 20$)の関数としてプロットされた主要コンポーネント解析を示す。

図30aはピクセル強度として図29のベクトル積 BV_{20} の値を用いて得られた黒および白色強度イメージを示し、図30bおよび30cは図29のベクトル積 BV_{10} および BV_{13} の値を用いて得られた黒および白色強度イメージを示す。

好ましい実施例の説明

本発明は、医療診断、治療および生物学的研究用に用いることのでき

る分光生物撮像方法に関する。特に、本発明は、光の透過、反射、散乱および蛍光発光法を用い、高い空間および分光解像度で、空間的機構を検出し、細胞および組織成分、構造および、プローブや薬物等、投与された成分を定量するために用いることができる。したがって、本発明は、例えば、生体細胞の解剖および生理を研究し、単一の測定で多くの遺伝子および染色体を効果的にマップし、切片中の癌性もしくは他の病的な細胞および組織を顕微鏡下もしくは生体中でマクロレンズもしくはいずれかのタイプの内視鏡もしくは基底部カメラを通して、例えば除去すべき組織の手術中に手術医をガイドする目的で検出および同定するために、結果の解釈および有用な表示を主として強化された撮像形状で可能にする。

図4～30に示す本発明をよりよく理解するために、まず、図1に示すように

2次元の検出器アレイを利用した従来の（従来技術の）スリット型撮像分光計の構造および作用を参照する。

すなわち、図1に示す従来技術の撮像分光計は、4で概略的に示す対象からの入射光を集光し、対象4の略平行光を、スリット6を有する第1の焦点面に収束させて視野を形成するための2で示す集光光学系を備える。スリット6から出射する光はコリメータレンズ8でコリメートされ、分光散乱要素10（例えば回折格子）を通して、様々な波長が分離される。分光散乱要素10からの出力は収束レンズ12によって第2に焦点面内の二次元検出器アレイ上に収束される。検出器アレイ14の出力は信号処理装置16に送られる。

図1の従来技術の撮像分光計に示された2次元検出器アレイにおいては、系の運動（例えば矢印13で示すラスタ運動もしくは直線走査）が第1次元に沿った走査を行う。第2次元の走査は系の運動方向に垂直に配されたスリット6によって行われる。したがって、スリット6はア

レイ14内の各検出器があらゆる時間において1つのピクセルが単一の波長に寄与するように機能することを保証する。これは各ピクセルのスペクトルを分離するために必要である。

背景技術の欄および上記で述べたように、図1に示す従来技術の欠点は、光学系2がすべてのピクセルから実際に同時にエネルギーを集めるにも関わらず、1フレームのピクセルの多くは任意の時間には測定されないことである。その結果、所要フレーム時間は有意に増大し、また／もしくはSN比（感度）はこのようなスリットを必要としない系に比べて顕著に低下する。

図2は本願に充分記載されたものとして引用するカビブ等(Cabib et al)の1995年2月21日出願の米国特許出願08/392,019号に開示された改良型の従来技術の撮像分光系を示すブロック図である。この撮像分光計は本発明の撮像を実施するのに極めて適した構成を有する。

すなわち、図2に示す従来技術の撮像分光計は、20で一般的に示される集光光学系、ブロック22で示される1次元スキャナ、ブロック24で示される光路差(OPD)発生器もしくは干渉計、ブロック26で示される1次元もしくは2

次元検出器アレイ、およびブロック28で示される信号処理装置およびディスプレイを含む。

系20において重要な要素はOPD発生器もしくは干渉系24であり、これは分析されるべき対象の各ピクセルから出射する光の分光強度の所定の一次結合に対応する変調光を出力する。干渉計の出力は検出器アレイ上に収束される。したがって、スペクトル再生に必要なすべての情報を得るため、すべての必要な光学位相差は視野のすべてのピクセルについて同時に走査される。対象中のすべてのピクセルのスペクトルはこのようにして撮像情報と同時に収集され、像の分析がリアルタイムで可能

となる。

米国特許出願08/392,019号による装置は様々な構成で実施することができる。特に、使用される干渉系は米国特許出願08/392,019号の関連する図面に記載されるように他のミラーと組み合わせることができる。

すなわち、米国特許出願08/392,019号によれば、他の型の干渉計が使用可能である。これらは、上記米国特許出願にさらに記載されるように、(1) OPDを変化させて光を変調する移動型干渉計、すなわち、走査厚を有するファブリーペロー型干渉計、(2) 光学集光計からの光線を受容するビームスプリッタおよびスキャナを含み、光線を2つの経路に分割するマイケルソン型干渉計、(3) OPDが入力光線の入射角度によって変化する、他の光学手段と結合させることもできるサニャック型干渉計、および(4) 4つのミラーとビームスプリッタとを加えた干渉計を含む。

図3はOPDが入力光線の入射角度によって変化する干渉計を利用する米国特許出願08/392,019号によって構成された撮像分光計を示すものである。光軸に対して小さな角度で干渉計に入射する光線はこの角度に対して直線的に変化するOPDを付与される。

図3の干渉計において、全ピクセルにおいて光源30からの光線は光学集光系31によってコリメートされた後、機械的スキャナ32によって走査される。次いで、光はビームスプリッタ33を通過して第1の反射鏡、さらに第2の反射鏡

35に到達し、後者によって反射されてビームスプリッタ33に戻り、これを通して、収束レンズ36を通して検出器アレイ37（例えばCCD）に至る。この光線は33、第2の反射鏡35、そして最後に第1の反射鏡34によって反射された光線と干渉する。

1走査の最後で各ピクセルはすべてのOPDで測定され、したがって、対象の各ピクセルのスペクトルはフーリエ変換で再構築される。光軸に平行な光線は補償され、光軸に対して角度 (θ) を有する光線はビームスプリッタ33の厚さ、その屈折率、および θ の関数であるOPDを付与される。小さな角度においては、OPDは θ に比例する。適当な反転および注意深い記録によって、各ピクセルのスペクトルが計算される。

図3の構成において、角度 β （図3では $\beta = 45^\circ$ ）でビームスプリッタに入射する光線はOPD=0で干渉計を通過し、一般角 $\beta = \theta$ で入射する光線は次式(1)で与えられるOPDを付与される。

$$OPD(\beta, \theta, t, n) = t[(n^2 - \sin^2(\beta + \theta))^{0.5} - (n^2 - \sin^2(\beta - \theta))^{0.5} + 2\sin\beta\sin\theta] \quad (1)$$

ここで、 β はビームスプリッタに対する光線の入射角、 θ は光軸からの光線の角距離もしくは中心位置に対する干渉計の回転角、 t はビームスプリッタの厚さ、 n はビームスプリッタの屈折率である。

式1によれば、中心角に対して正および負の角度の双方で走査を行うことにより、各ピクセルについて両面インターフェログラムを得ることができ、これによって、相誤差の解消を促進し、より正確なフーリエ変換計算が可能になる。走査振幅により到達最大OPDが決定されるが、これは測定の分光解像度に関係する。一方、角度ステップの大きさは系が感度を有する最短波長によって決定される。実際にサンプリング理論 [Chamberlain (1979), The Principles of Interferometric Spectroscopy, John Wiley and Sons, 53~55ページ参照] によれば、このOPDステップは系が感度を有する最短波長の半分未満でなければならない。

考慮すべきもう1つのパラメータはマトリックス中の検出器要素の微

小寸法である。収束光学系を通して、要素は干渉計中に微小なOPDを画定し、これによってインターフェログラムを矩形関数で畳み込む効果を有する。この結果、短波長において系の感度が低下し、要素によって画定されたOPD以下の波長についてはゼロまで低下する。このため、変調伝達関数(MTF)条件が満足されること、すなわち、干渉計の検出器要素によって画定されるOPDが装置が感度を有する最短波長よりも小さいことを保証しなければならない。

したがって、米国特許出願08/392,019号に開示された発明に従って構成された撮像分光計は単に視野内の各ピクセルから入射する光の強度を測定するだけでなく、所定の波長範囲における各ピクセルのスペクトルをも測定する。また、これらは任意の時間において視野内の各ピクセルによって出射されたすべての光線をより良く利用し、したがって、上述のように、フレーム時間の顕著な減少および/または分光計感度の顕著な増大を可能にする。このような撮像分光計は様々な型の干渉計および光学集光および収束系を含むことができ、したがって、医療診断および治療および生物学的研究用途、地質学的および農業的調査のための遠隔探査等の広範な様々な用途に使用することができる。

米国特許出願08/392,019号に開示される発明による撮像分光計はイスラエル国ミグダルヘマク、インダストリアル・パークのスペクトラル・ダイアグノスチックス(SD)社(Spectral Diagnostics Ltd., Industrial Park, Migdal Haemek, Israel)によって開発されたものであり、以下、スペクトラキューブ(SpectraCube™)と称する。様々な光学器具に光学的に接続されたスペクトラキューブシステムは本発明の方法を実施するために使用された。スペクトラキューブシステムは表1に示すような特性を有する。

表 1 :

特性	性能
空間解像度	$30 / M \mu m$ (M =顕微鏡もしくは全面光学要素の有効倍率)
視野	$8 / M mm$
感度	20ミリラックス (積分時間100msec に対するものであり、積分時間が長くなるにつれて \sqrt{T} に対して直線的に増大する)
分光範囲	400~1000nm
分光解像度	400nmで4nm (800nmで16nm)
取得時間	5~50秒、典型的には25秒
FFT処理時間	20~180秒、典型的には60秒

スペクトラキューブシステムは、例えばC-マウントもしくはF-マウントコネクタを介して容易にあらゆる顕微鏡もしくはマクロレンズに取り付けられ、測定中はあらゆる向きに配することができる。また、このシステムは他の拡大手段および様々な型の内視鏡およびカメラに接続することができる。したがって、細胞および組織の分光像を様々な倍率および照明法で得ることができる。

分光像の表示および分析

a. 一般論

上述のように分光像は、分光情報を像の空間機構と組み合わせる3次元のデータアレイ $I(x, y, \lambda)$ である。このため、分光像はその次元性から分光キューブと称される1組のデータであり、これは他の手段では得ることが困難で場合によっては不可能である特性の抽出および量の評価を可能にするものである。分光光学およびデジタル画像分析は莫大な量の文献 [例えば、Jain(1989), Fundamentals of Digital Image Processing, Prentice-Hall Internationalを参照] によって言及されているため、以下の説明は主として単一のデータセット、すなわ

ち分光キューブに分光および画像情報を組み合わせることの利点に的を絞っている。

分光キューブの可能な分析型の1例は分光および空間データを別々に用いること、すなわち、分光アルゴリズムを分光データに、2次元画像処理アルゴリズムを空間データに適用するものである。

分光アルゴリズムの1例として、各ピクセルでの強度が「類似性」の程度に比例するグレイ（もしくは他の色）スケールの像（類似性マップ）を形成する、参照スペクトルと全ピクセルのスペクトルとの間の類似性を演算するアルゴリズムを考える。グレイスケール像はさらに、所望の特性およびパラメータを抽出するために画像処理およびコンピュータ画像法（例えば、画像強調、パターン認識等）を用いてさらに分析することができる。換言すれば、類似性マッピングは参照スペクトル（ライブラリに予め記憶されたものでも同一もしくは他の分光像のピクセルに属するものでもよい）と分光像の各ピクセルとの差の絶対値の積分を演算し、グレイレベルもしくは偽カラー（白黒もしくはカラー）像を表示す

るものであり、この像では明るいピクセルが小さな分光差、暗いピクセルが大きな分光差、あるいはその逆にそれぞれ対応する。

同様に、分類マッピングは類似マッピングについて記載されたものと同じ計算を行い、表示された像の各ピクセルを、その分類に従って、数種の参照スペクトルのうちの1つに最も類似した所定の異なった偽カラーでペイントする。

また、非分離演算に基づいた分光像アルゴリズム、すなわち、局所的分光情報および隣接ピクセル間の空間的相関を含むアルゴリズム（これらのアルゴリズムの1つは後述のように主要素分析である）を適用することもできる。

分光キューブ（すなわち、 $I(x, y, z)$ ）のようないずれかの3次元（3D）データを取り扱う際に自然に生じる要求の1つは意味のあるようにそのデータ構造を可視化することである。断層撮影データ等、例えば共焦点顕微鏡によって得られ、各点が一般に3次元空間の異なった場所（ x, y, z ）における強度を示す他の型の3Dデータとは異なり、分光像は異なった波長における同一の2次元面（すなわち、サンプル）の強度を示す像のシーケンスである。このため、

データの分光キューブを観察するための2つの最も直感的な方法は像面（空間データ）もしくは1ピクセルまたは1組のピクセルを波長の関数として3次元山谷ディスプレイで観察するものである。一般に、像面はいずれかの単一の波長で測定された強度もしくは各像ピクセルにおいて所望の分光領域にわたって分光分析アルゴリズムを適用した後に得られるグレースケール像を表示するために用いることができる。分光軸は、一般に、いずれかの所望のピクセル近傍で行われるある種の空間演算（例えばスペクトルの平均化）の結果として得られるスペクトルを表示するために使用することができる。

例えば、分光像を、単純な白黒カメラで得ることのできるような像に類似したグレースケール像として、あるいは1つもしくは数種の人工色を用いて重要な特性を強調もしくはマップした多色像として表示することが可能である。このようなカメラはCCDアレイの分光領域（例えば400nm～760nm）にわたって光学信号を単純に積分するものであるため、「相当する」白黒CCDカメラ像は以下のように分光軸に沿って積分することによって3D分光像データベースから算出することができる。

$$\text{gray_scale}(x, y) = \int_{\lambda_2}^{\lambda_1} w(\lambda) \cdot I(x, y, \lambda) d\lambda \quad (2)$$

式2において、 $w(\lambda)$ は、すべて適当に重み付けされた像のいくつかの分光領域にわたる積分に基づく様々なグレースケール像を算出するための一般的な重み付け応答関数である。例えば、それぞれ赤（R）、緑（G）、青（B）に対する三刺激性応答関数に対応する3つの異なる重み付け関数 $\{w_r(\lambda), w_g(\lambda), w_b(\lambda)\}$ で式(2)を評価すると、従来のRGBカラー画像を表示することが可能である。また、意味のある新規の（偽）カラー画像を表示することもできる。図4はこの単純なアルゴリズムのパワーを示す1例である。 $\{w_r(\lambda), w_g(\lambda), w_b(\lambda)\}$ を関心のあるスペクトルの内部に配分されたガウス関数と考えると、この場合に結果として表示される偽カラー画像は重み付け関数に対応する分光領域中のデータのみが強調され、これら3領域の分光差はより明確に検出できるようになる。

b. 点演算

点演算は単一のピクセル（一度に1つより多くのピクセルに関与しない）演算として定義される。例えば、グレースケール像において、点演算は、所定の変換関数に従って各ピクセルの強度（強度関数）を他の強度にマップする演算とすることができる。この型の変換の特定の例は各ピクセルの定数による乗算である。

点演算の概念は分光像に拡張することができる。ここで、各ピクセルはそれ自体の強度関数（スペクトル）、すなわち n 次元ベクトル $V_1(\lambda)$; $\lambda \in [\lambda_1, \lambda_n]$ を有している。分光像に適用される点演算は各ピクセルのスペクトルを以下の変換関数によってスカラー（すなわち強度値）にマップする演算として定義することができる。

$$v_2 = g(V_1(\lambda)) ; \lambda \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (3)$$

この型の点演算の1例は式3に従ってグレースケール像を構築するものである。より一般的な場合、点演算は各ピクセルのスペクトル（ベクトル）を以下の変換関数に従って、他のベクトルにマップする。

$$V_2(l) = g(V_1(\lambda)) ; l \in [1, N], \lambda \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (4)$$

ただし、 $N \geq n$

この場合、分光像は他の分光像に変換される。

ここで、点演算の定義は異なる分光像の対応するピクセル間の演算を含むように拡張することができる。この型のアルゴリズムの重要な例は光学濃度分析である。光学濃度は分光的に調査されている対象の領域を透過スペクトルよりも高いダイナミックレンジで強調し、図示するため

に用いられる。光学濃度は対数演算によって透過に関係し、したがって、正関数である。光学濃度と測定されたスペクトルとの間の関係はランベルトーベールの法則によって与えられる。

$$OD(\lambda) = -\log_{10} \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = -\log_{10} \tau(\lambda) \quad (5)$$

ここで、 $OD(\lambda)$ は波長の関数としての光学濃度、 $I(\lambda)$ は測定されたスペ

クトル、 $I_0(\lambda)$ は測定された参照スペクトル、 $\tau(\lambda)$ はサンプルの分光透過率である。式5は、 $I_0(\lambda)$ を(1) ODが計算されたものと同一の分光キューブ中のピクセル、(2) 第2のキューブ中の対応するピクセル、および(3) ライブラリ由来のスペクトルから選ばれたものとし、各波長で各ピクセルについて計算される。

光学濃度は測定系の分光応答性にもCCD検出器の不統一性にも依存しないことに注目されたい。このアルゴリズムは相対濃度をマップするのに有用であり、サンプル中の吸収体の吸収係数およびサンプルの厚さが既知である場合には、これら吸収体の絶対濃度をマップするのにも有用である。したがって、以下の請求項に用いられる「レベル」という語は「量」、「相対量」、「絶対濃度」および「相対濃度」をも意味するものである。

他の例には様々な一次結合分析、例えば、(1) 加算、減算、乗算、除算、およびそれらの組み合わせ等の算術関数によって所定のスペクトルをピクセル各々のスペクトルに適用して新たな分光キューブを得、各ピクセルの得られたスペクトルを第1のキューブの各スペクトルと選択されたスペクトルとの合計、差、積、商、およびそれらの組み合わせとするもの、および(2) 所定のスカラーを上述の算術関数によって分光

像のピクセルの各々のスペクトルに適用するものが含まれる。

このような一次結合は、例えば、背景領域に位置するピクセルのスペクトルをピクセル各々のスペクトルから減算する背景サブトラクションおよびサンプル分析に先だって測定されたスペクトルを用いて分光像中のピクセルの各々のスペクトルを分割する校正工程に用いることができる。

他の例にはグレーレベル画像としての比画像計算および表示が含まれる。このアルゴリズムは分光像の各ピクセルについて2つの異なる波長における強度の間の比を計算し、これに対応してピクセル各々をより明るいもしくはより暗い人工色でペイントするものである。例えば、比が高いピクセルはより明るく、比が低いピクセルはより暗く（あるいは逆に）ペイントし、分光感度を有する物質の分布を表示する。

c. 空間分光組み合わせ演算

上述の分光像分析方法のすべてにおいて、アルゴリズムは分光データに適用される。分光的に処理されたデータを画像として表示することの重要性は、主に定性的であり、使用者に有用な画像を供給することにある。しかしながら、その用途によっては、分光像に固有の空間分光相関を利用するアルゴリズムを適用することにより、入手可能な画像データをより意味のあるように用いることも可能である。空間分光演算は分光像分析の最も強力な型を代表する。1例として、以下の場合を考える。

サンプルはk種の異なった蛍光体で染色されたk種のセル型を含有している（ここで用いられる「セル」という語は生物細胞および「器具の視野内の領域」の双方を意味する）。各蛍光体は別個の蛍光発光スペクトルを有しており、k種のセル型のうちの1つのみに結合する。k種の

セル型の各々についてセル当たりの平均蛍光濃度を知ることが重要である。この仕事を達成するためには、以下の手順、すなわち、（1）画像中の各ピクセルをそのスペクトルに従って $k+1$ のクラス（k種のセル型プラス背景）に分類し、（2）画像を様々なセル型に分割し、各型由来のセル数をカウントし、（3）各クラスの寄与する蛍光エネルギーを合計し、これを対応するクラス由来のセルの総数で除算することからなる手順を用いることができる。

この手順は分光および空間データの双方を使用する。関連する分光データは特徴的なセルスペクトルの形状（すなわち分光「シグネチャ」）を有し、空間データはその多くが目には類似して見える様々な型のセル（すなわち、セルプロップ）からなる。この型の場合に対して理想的な型の測定は分光像である。上記の場合、セルはそれらの特徴的分光シグネチャによって区別することができる。よって、適当な点演算を行うことによって、各ピクセルが $k+1$ の値の1つに割り当てられた人工画像を生成する。異なったセル型の蛍光発光スペクトルが $S_i(\lambda)$ ； $i=1, 2, \dots, k$ ， $\lambda \in [\lambda_1, \lambda_n]$ として既知であり、各ピクセル (x, y) で測定されたスペクトル (x, y) が $S_{x,y}(\lambda)$ ， $\lambda \in [\lambda_1, \lambda_n]$ であるとする、以下のアルゴリズムが可能な分類法（上記のステップ1）で

ある。

e^2_i をセル型1に付着した蛍光体の既知のスペクトルからの測定されたスペクトルの偏差とする。この場合、最小2乗された「距離」の定義を採用すると、

$$e^2_i = \sum_{\lambda \in R_1} (s(\lambda) - s_i(\lambda))^2 \quad (6)$$

が得られる。ここで、 R_1 は関心のある分光領域である。画像の各点[ピ

クセル(x, y)]は次いで以下の基準を用いてk+1のクラスの1つに分類することができる。

$$\text{点}(x,y) \in \text{クラス}k+1 \text{ if } e^2_i > \text{閾値 for 全 } i \in [1,k] \quad (7)$$

但し、点(x,y) ∈ クラス ρ if $e^2_i > \text{閾値}$ 、

$$\rho \text{ は } \min[e^2_i] = e^2_\rho$$

ここで、上述のステップ2および3（画像分割および平均蛍光強度の計算）は式6および7に記載されたアルゴリズムに従って形成された人工画像上での標準的なコンピュータ画像演算を用いて直接行われる。

他の方法は各ピクセルで測定された $s_{x,y}(\lambda)$ をk種の既知のスペクトル $s_i(\lambda)$; $i = 1, 2, \dots, k$ の一次結合としてとして表現するものである。この場合、以下の解となる係数ベクトル $C = [c_1, c_2, \dots, c_k]$ を得る。

$$F = \min \sum_{\lambda \in R_1} (s(\lambda) - \hat{s}(\lambda))^2 \quad (8)$$

$$\text{但し、} \hat{s}(\lambda) = \sum_{i=1}^k c_i \cdot s_i(\lambda)$$

$dF/dc_i = 0$ を $i = 1, 2, \dots, k$ について解く（すなわち、Fを最小とする c_i の値を得る）と、マトリクス式 $C = A^{-1} B$ (9)、

$$\text{但し、} A \text{ は要素 } a_{m,n} = \left[\sum_{\lambda \in R_1} s_m(\lambda) \cdot s_n(\lambda) \right] \quad (10)$$

の次元kの正方行列、

$$B \text{ は、 } b_m = \left[\sum_{\lambda \in R_1} s_m(\lambda) \cdot s(\lambda) \right] \quad (11)$$

として定義されるベクトル、が得られる。

算術演算を同様に2つ以上の分光キューブおよび／もしくは所定のピ

クセルのもしくはライブラリ由来のスペクトルに適用することができる。例えば、データの第1の分光キューブおよびデータの第2の分光キューブに属するピクセルに属する対応するピクセル対の対応する波長間で算術演算を適用し、例えば、データの2つの分光キューブの平均化、時間変化のフォローアップ、分光標準化等の目的でデータの第3の分光キューブを得ることが考えられる。

多くの場合、分光像に存在する対象（例えばセル）はその化学的構成要素および／もしくは構造が互いにいくらか異なっている。共分散もしくは相関行列を生成することによる主要成分分析を用いると、これらの小さな差が増大する。以下に、共分散行列を用いた主要成分分析を簡単に記載する。主要成分分析に関する詳細については Martens and Naes (1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, 英国、および Esbensen et al. 編 (1994), Multivariate Analysis-inpractice, Computer-aided modeling as CAMO、および Unscrambler's User's guide, Trondlheim, ノルウェーを参照されたい。

すなわち、ここで波長 λ_i ($i = 1, \dots, N$) での画像のピクセルの強度は長さがピクセル数 q に等しいベクトルと考えられる。これらのベクトルが測定波長に対して1個ずつ、計 N 個あるため、これらベクトルは q 行 N 列の行列 B' に配列することができる。

$$\begin{array}{ccc}
 & \text{波長数} & \\
 & B'_{11} \cdots B'_{1N} & \\
 B' = \text{ピクセル数} & \begin{array}{c} \cdot \\ \cdot \\ \cdot \end{array} & \begin{array}{c} \cdot \\ \cdot \\ \cdot \end{array} \\
 & B'_{q1} & B'_{qN}
 \end{array} \quad (12)$$

行列 B' の列各々について平均

$$M_i = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q B'_{ji}; i = 1 \dots N \quad (13)$$

を定義し、第2の標準化行列 B を

$$\begin{array}{ccc}
 & \text{波長数} & \\
 & B'_{11}/M_1 \cdots B'_{1N}/M_N & \\
 & \cdot & \\
 B = \text{ピクセル数} & \cdot & \\
 & \cdot & \\
 & B'_{q1}/M_1 & B'_{qN}/M_N
 \end{array} \quad (14)$$

として定義する。

共分散行列 C を行列 B に対して次元 $N \times N$ の $C = B^T \cdot B$ として定義する。 C は対角化し、固有ベクトルおよび固有値は $C \cdot V_i = \mu_i \cdot V_i$ 、ただし、 V_i は N 個の直交単位ベクトルであり、 μ_i は i 番目の単位ベクトル V_i の方向における分散を示す固有値である。一般に、最小成分がピクセルの関数として最高の変動性を示す。

積 $B V_i$ ($i = 1, \dots, N$) は直交基底部の要素上への分光像の射影であり、黒色画像および白色画像として別々に表示することができる。これらの画像は所定の波長でフィルターされた通常の白黒画像からは明確に得られない特性を明らかにすることができる。

分光生物撮像系は、画像中の化学的構成要素間もしくは機構にわずかな分光差が存在するすべての用途で潜在的に有用である。測定は事実上

いかなる光学系を用いても行うことができる。今日存在する撮像装置と本発明を使用することのできるそれらの用途は以下の通りである。

(1) 反射顕微鏡、透過顕微鏡、蛍光顕微鏡、垂直倒立顕微鏡、暗視野顕微鏡、共焦点 (正常・定在波共焦点) 顕微鏡、反射コントラスト顕微鏡等を含む様々な型の顕微鏡。これらの校正は生物学的研究、薬物開発業界、(臨床的および解剖学的) 病理学における細胞および組織分類、血液学、最近の型を検出するための尿分析、遺伝子同定および (間期および有糸分裂の中) 染色体におけるマッピング、遺伝病診断、細胞オルガネラ解剖学および生理学、核内におけるクロマチン分布および濃縮、細胞質マッピング、核膜マッピング等に使用することができる。

特に、これらの構成は自動装置として、あるいは、染色済もしくは未染色

の、細胞塗末スミアもしくは組織切片に由来するある細胞が病的か健康かを、病的である場合にはその疾患の型および段階を生理学者が決定するための器具として構築することができる。例えば、これらの構成は子宮頸癌のパップ塗末スミア分析、異なる型の白血病に関する血液塗末スミア分析等に用いることができる。

(2) 正常レンズ、マクロレンズ、ズーム等を含む様々な型のカメラレンズ、および皮膚、角膜、髪、および他の人体外部組織を反射、自動蛍光、もしくは投与されたプローブ蛍光もしくは薬物誘導蛍光によって撮像するための眼科カメラ。これらの構成の定型的な用途には(1)皮膚癌のマッピング、(11)黒色腫と母斑(ほくろ)との区別化、(111)ポートワイン様斑マッピングおよび他の皮膚色素沈着病、(iv)処理前、中、および後に処理時間を最適化(副作用を最小化)するために行われるフォトダイナミック療法(PDT)、(v)角膜病が含まれる。

(3) 腹腔鏡、可撓性もしくは剛性のファイバ光学要素を含む細胞鏡、および肺、胃、腸、膀胱、結腸、前立腺、子宮頸部、動脈、静脈、心臓等、いずれかの体内組織を、例えば、白色光の反射、自動蛍光、およびレーザ誘導蛍光等あらゆる検出モードで、通常および時分割状態の双方で、短波長および多波長励起の双方を用いて、撮像するのに適した他の内視鏡を含む様々な型の内視鏡。これらの構成の円形的な用途は診断用の癌細胞マッピングおよび病理学者および手術前、中、後の外科医のための分析器具、および手術中に病的組織の境界を正確に可視化するためのものを含む。

(4) 基底部カメラもしくは様々な基底部鏡、すなわち(1)糖尿病もしくは他の健康状態によって引き起こされる虚血のようなあらゆる型の網膜疾患を、分析および初期診断器具の双方として、また網膜のどの部分が冒され、病的血管および網膜組織をマップするために現在使用されているフルオレセイン血管撮影法の追加物もしくは置換物として、何時治療するかを決定するための治療器具として、マップするために用いられるもの、(11)網膜のレーザ治療中に眼科医が光凝固もしくは切除すべき組織の領域および/もしくは境界を示すための器具とするもの。

上述のように、透過、反射、散乱および蛍光光学における分光生物撮像系には多くの実験方法および特定の用途がある。よって、全般に、光のような分析すべき放射線は広範な供給源に由来するものとすることができる。例えば、供給源は放射線を自然に出射するものであってもランプもしくは他の照明された物体からの放射線を反射もしくは透過するものであってもよい。また、UVやレーザ等の適当な照明と共に、また照明波長が撮像分光計に到達するのを防止する適当な手段と共に、各場合

に問題となる単数もしくは複数の対象に関する異なった情報を得るために、蛍光もしくはラマン分光撮像測定を行うことができる。

蛍光顕微鏡法

a. 一般論

多数の染料の使用 [Jain(1989), Fundamentals of Digital Image Processing, Prentice-Hall International参照] は組織および細胞分析器具のうち、最も強力かつ一般的なもの1つである。したがって、蛍光顕微鏡法は光学顕微鏡に用いられる最も重要な実験方法のうちの1つである [Lakowicz(1983), Principles of Fluorescence Spectroscopy Plenum Press, New York, London]。蛍光プローブのパワーは主として特定の染料が結合する生物学的構造の多様さによる [Waggoner(1986), Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences, Taylor et al編, New York; Alan R. Liss, Inc, 3~28ページ]。蛍光プローブの詳細な検討については、Mason (編) (1993) Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Techniques Series, Sattelle 編集, Academic Press Limited, London、およびPloem and Tanke(1987), Introduction to Fluorescence Microscopy, Oxford University Press, Royal Microscopical Societyを参照されたい。

新規かつ、より洗練された多色蛍光染料分子の急速な開発により、これらの染料の潜在力を充分に利用することのできる、より進んだ蛍光撮像技術への要求が形成され続けるであろう。蛍光染料がこれまで与え、今後も、現在行われている研究の過程で与えるであろう革命的な衝撃についての議論に関しては、Taylor e

t al(1992), The New Vision of Li

ght Microscopy, American Scientist, 80巻、322～335ページを参照されたい。

分光生物撮像は単純なフィルタに基づく方法に対して蛍光撮像用途にいくつかの重要な利点を提供する。これらの利点には以下のものが含まれる。(1) 関心のあるサンプル中の染料分子の実際の挙動に対してより多くの定量的知見を提供する完全なスペクトルの測定。(2) 望ましくないバックグラウンド発光によって起こる従来の問題の多くを解消する能力。(3) 蛍光プローブの発光スペクトルにそのマイクロ環境(例えば温度)によって生じる望ましくないあるいは予想できない分光シフトを考慮してプローブ濃度を決定できるが、これに対して、蛍光強度がバンドパスフィルタを用いてのみ測定される場合、このような分光シフトは検出されず、プローブ濃度分析時に顕著な誤差を引き起こす。(4) 蛍光像取得の単純化、そして、以下詳細に述べるように、適当な分光分析アルゴリズムと共に使用される場合、単一の測定で、多くの分光的に重なった蛍光染料を分離かつマップすることが可能である。実際に、多変数分析、主要成分回帰および他の分類アルゴリズムのような洗練されたデータ分析アルゴリズム(Martens and Naes(1989), Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain 参照)を適用することにより、多くの分光的に関連したパラメータを同時に分析することが可能である。

分光生物撮像は、望ましくないバックグラウンド発光に関連する問題を解消する手段を提供する。蛍光撮像顕微鏡法は典型的には、サンプルが所望の短波長で励起されかつプローブの蛍光発光に対応する限られた分光帯域の波長のみが検出器(例えば、眼、カメラ等)に到達するように保証する蛍光フィルタキューブを用いて行われる[Mason(編), Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Series, Sattelle編集, Academic Press Limited, London]。蛍光強度は通常、励起源よりも数オーダー低いので、このようなバックグラウンド発光は完全には除去できない[Benson et al(1985), Cell Biol., 100, 1309～1323ページ]

ジ]。望ましくないバックグラウンド発光の3つの主要な供給源は以下の通りである。(1)ジクロイックミラーコーティングおよび/もしくはフィルタで完全には遮断されない励起源からの放射線、(2)サンプルおよび時には光学要素にも由来する自然蛍光は顕著にバックグラウンド蛍光に寄与する。サンプル自然蛍光の効果は通常、吸収および発光帯域が測定サンプルのそれらと重ならない蛍光プローブを選択することによって低減することができる。同様に、自然蛍光を低減するように適当にコーティングされた光学要素を選択することによっても、この種の自然蛍光は最小化することができる。(3)励起フィルタ、ジクロイックミラーおよびバリアフィルタの不適當な(もしくは最適でない)組み合わせ。

入手可能な最善のフィルタリング方法であっても、望ましくないバックグラウンド発光によって、関連する発光をそのバックグラウンド(ノイズ)から引き出すことはしばしば困難となり、時には不可能となる。一方、分光生物撮像系は(i)蛍光染料の分光形状および分光領域と(ii)バックグラウンド発光(自然蛍光を含む)の分光形状および分光領域との間の分光差を用いて、望ましくないバックグラウンド発光の効果を除去することができる。

したがって、適当な分光像分析方法を蛍光プローブの発光スペクトルに適用することにより、蛍光撮像測定のス/N比、したがって、その精度を向上させることが可能である。結果の定量化が望まれる場合、この分光生物撮像方法の利点は比撮像に特に重要である。また、分光生物撮像系は、フィルタをベースとした測定で最適のフィルタを選択するのに

費やされる時間および労力を節約することができる。

蛍光測定において分光撮像が、望ましくないバックグラウンド強度をどのように除去することができるかの1例を図5a~5bに示す。図5aは沃化プロピジウムで染色された細胞の蛍光分光像を示す。この像はオリンパス社の倒立顕微鏡(IMT2)に取り付けられたスペクトラキューブを用いて得たものである。サンプルは水銀光源で照明し、蛍光強度はDMGフィルタキューブ(DM580ジクロイックミラー、D590励起フィルタおよびBP545バリアフィルタ)を通して撮像した。図5bは3つの別個の像ピクセルに由来する蛍光発光スペクト

ルをプロットしたものである。3つのスペクトルが各々2つのピークを有していることに着目されたい。623 nmのピークは沃化プロピジウムの実際の蛍光発光スペクトルによるものであり、775 nmの第2ピークは励起もしくはバリアフィルタで完全には除去されなかった励起光の残りに過ぎない。この望ましくないバックグラウンド放射線はさらに別の励起フィルタ（例えばオリンパス社のPB460）もしくは適当なバリアフィルタを追加することによって除去可能である。しかしながら、同じ測定が（PB460フィルタを用いない、非分光）撮像系で行われたとすると、各ピクセルで測定された強度は、775 nmピークの望ましくない信号の寄与を含む図5 bに示したスペクトルの積分に比例することになる。この状況を改善するように、従来のCCD像に適用することのできる補正アルゴリズムが存在するが、ノイズを伴う [Benson et al(1985), Cell Biol. 100, 1309~1323ページ]。しかしながら、各ピクセルでの蛍光を波長の関数として測定する分光生物撮像系を用いれば、容易に分析を、関心のある蛍光染料の発光に対応する波長（例えば623 nmピークの周辺）のみに限定し、そして、図5 aに示す像において行われたように、残存する偽の供給源の信号への寄与を除去することができ

る。

本発明の方法による分光生物撮像のパワーを適当な蛍光標識と組み合わせることにより、多色蛍光像の取得は大幅に単純化させることができる。分光撮像によって得られる利益を十分に認識するためには、多数のプロープを含有するサンプルからの蛍光を測定するためにフィルタをベースとする方法を使用する場合の典型的な工程を考える。まず、互いに十分に異なる吸収および発光スペクトルを有するプロープを選択しなければならない。現在、実際には、この要求により、試料中の蛍光標識の数は3ないし5に制限される。次いで、励起波長を選択するための1つと発光スペクトルを捕捉するための1つとからなる2つのフィルタホイールを回転することにより、あるいは、励起波長を選択するための1つのフィルタホイールを回転する一方で3重ジクロイックフィルタで発光スペクトルを捕捉することにより、各染料に対して1つずつ蛍光像を得る。（運動部のない）回転

可能なフィルタを用いて励起および／もしくは発光波長を制御する方法も提案されている。近年、多分光干渉フィルタを用いて多数の蛍光体を撮像することが可能になった [Lengauer et al(1993), Human Molecular Genetics 2, 502～512ページ]。(例えばフィルタキューブを交換することによって)ジクロイックミラーを交換する手段も必要である。各波長において像の焦点を再調節することも頻繁に必要となり、時には、より高いS/N比を得るために、CCDカメラの露光時間さえも代えなければならない。この結果得られる、各々異なった蛍光染料の発光に対応する白黒画像は次いで疑似着色され、(容易に得られる市販ソフトウェアと共にデジタルコンピュータを用いることによって)重ね合わされる。こうして得られる画像は数個の蛍光標識の位置をそれぞれ異なる偽カラーで示す。ジクロイックミラーの位置のわずかな変化によってデジタル画像が並進シフトするため、多波長ジク

ロイックミラーの使用 [4重波長バンドパス特性を有するジクロイックの使用についてはHiraoka et al(1992), Seminars in Cell Biology, 第2巻、153～164ページを参照されたい] または重ね合わせに先立つ画像の位置合わせが必要である。画像位置合わせ法はより一般的であるが、時間がかかり、しばしばわずかに満足な結果を生じるに過ぎない困難な問題である。これらはまた、多色蛍光像を得る際に考慮しなければならない技術的難関である [Waggoner et al(1989), Part B of Methods in Cell Biology, 第30巻、17章、449～448ページ、TaylorおよびWang編集、Academic Press社]。

したがって、本発明の分光生物撮像方法はフィルタをベースとする方法が蛍光撮像に課していた基本的な制限の1つを克服する。(後述のテキサスレッドおよびローダミン蛍光体の実施例に示されるように発光スペクトルが大幅に重なり合う染料を含む)無制限の数の蛍光染料の発光スペクトルを同時測定可能とすることにより、分光生物撮像は多数の蛍光プローブの発光像を順番に得る必要をなくす。使用される蛍光プローブが一般的な励起源で励起可能な場合、分光生物撮像系の使用による利点は最大となる。この場合、単一の分光像獲得により、ほぼ無制限の数の染料の蛍光発光を捕捉でき、(1)重なり合わない染料の選択、(2

）フィルタキューブの交換、（３）励起もしくは発光フィルタの交換、（４）焦点および／もしくは露光時間の最適化もしくは画像の位置合わせの必要がなくなる。もちろん、難点は一般的な供給源で励起できる適当な染料を選択することにある。

したがって、互いに授受される蛍光エネルギーで励起される染料は、分光生物撮像系を用いる多色蛍光撮像に最適である。明らかに、類似した発光特性を有する染料の使用は（例えば顕微鏡下における）視覚検出をより困難にする。しかしながら、この制限は本発明の分光生物撮像方法

を使用することによって解消される傾向にある。

b. 多数蛍光体の分光同定

本発明による分光生物撮像の使用により、数多くの染料（すなわち、蛍光体、蛍光部分）を１回の測定で同時に測定することが可能になる。染料の型にはなんら制限がなく、分光的に重なり合う染料（例えばローダミンとテキサスレッド）も後述（実施例５参照）のように適当なアルゴリズムを適用することによって同定し、それら出現を画像中にマップすることができる。多くの染料を同時に使用する場合、それらの励起波長、蛍光強度および発光スペクトルを注意深く考慮すべきである。これが適切に行われた場合、結果は定量的に分析することもできる。例えば、数種のタンパク質を、これらに特異的に結合する蛍光標識された適当な抗体を用いた単一の測定においてマップすることが可能である。標準的な校正された染料を用いて絶対濃度を測定することも可能である。多数蛍光プローブの検出が顕著な利点となり得る重要な１例はFISH（蛍光インシチュハイブリダイゼーション）[Emanuel(1993), Growth Genetics and Hormones 9,6~12ページ]であり、これは染色体レベルで遺伝子进行分析し、遺伝子増幅、欠落、転移、再配置等の遺伝子欠陥の可能性を発見するために用いられる。

多くの癌および出産欠陥を含むある種の病気および障害は１つ以上の遺伝子中の欠陥によって引き起こされる。他の多くの病気は遺伝子成分を有すること、すなわち、単独では病気を引き起こさないが、それに寄与し、あるいは生命の後期において病気を発展させる遺伝子欠陥が存在することが知られ、あるいは推測さ

れており、当分野においては、多因病および遺伝素因と呼ばれる現象である。既知の病気と可視遺伝子欠陥

との相関によって、医者は明確な診断をし、多くの病気の早期診断および治療を可能にする。遺伝子カウンセリングは予期される親や危険性のある個人に将来の潜在的かつ深刻な問題を警告することができ、適当な介入を可能にするものである。

これまでに5000を超える遺伝子的障害が同定され、それらの多くは多重遺伝子欠陥と関連づけられている。染色体が遺伝情報の担体であることが発見された後、科学者は特定の障害の原因となる染色体内の可視欠陥を実証することが可能であると推論した。1960年代にスライドグラスに展開された有糸分裂染色体の顕微鏡ベースの分類のために染色技術が開発された。数10年にわたり、染色体バンド化パターンはヒト遺伝子障害と有糸分裂染色体の観察される構造的異常とを相関させるために使用された。染色体は典型的にはギームザ染色（G-バンド化）の後に明視野顕微鏡法で観察されるか、あるいは、蛍光染色後に蛍光顕微鏡法で観察され、長さ方向に沿った特徴的な明暗バンドが明らかにされる。患者のバンド化パターンを正常な染色体のものと注意深く比較することにより、異常や遺伝子病を引き起こす転移（染色体間もしくは内での遺伝子物質の交換）、欠損（染色体もしくは染色体片の損失）、追加、反転および他の欠陥のような異常が明らかになる。

しかしながら、例えば、嚢性線維症（CF）や他の多くのもののような多くの深刻な遺伝子病は1つもしくは数個のヌクレオチドのみの追加、欠損もしくは置換を伴う突然変異によって引き起こされる。このような小さな欠陥は上述の染色体バンド化技術では検出不可能であり、多年にわたり、細胞遺伝学者は微小な欠陥を見いだしかつ定量化するための技術を開発しようと努力してきた。

蛍光インシチュハイブリダイゼーション（FISH）は過去25年間に多くの補完的技術の改良によって発展した。その出現は、染色体上の

遺伝子の正確な位置をマップするためのより良い器具を開発し、染色体の総染色

では可視化できない小さな遺伝子欠陥を検出しようとする細胞遺伝学者の要求によって促されたものである。ヒトの全遺伝子を同定かつマップしようとする大胆な計画であるヒトゲノムプロジェクト(HGP)はFISHに関心を認め、必要の多いDNAプローブの開発を促進した。また、現在のFISH技術は同時に強力な免疫学的プローブの開発、顕微鏡法および分光法用の優れた蛍光染料の種類を増大、および蛍光顕微鏡法に用いられる対物レンズ、照明器およびフィルタの劇的な改良によって可能となった。

FISHのパワーおよび有用性は多くの要因による。(1) FISHは分離された染色体および核のみならず固定されたパラフィン埋め込み組織切片内の全細胞に対しても使用できる。(2) これは比較的小さな欠陥を検出できる(より小さな欠陥を検出する能力は一定して増加している)。(3) これは結果を比較的迅速に提供することができる。(4) その適度な費用により、多くの診断および研究所での使用が可能である。(5) 様々なプローブおよび標本型に対する応用開発が可能である。(6) 高い特異性および感度を(7) 典型的には2時間である短い処理時間で得ることができる。

FISHの多くの用途においては、細胞遺伝学者は顕微鏡の接眼レンズもしくはモニター上の像を観察するだけで、蛍光標識が存在するか否かを決定することができる。いくらかより複雑な標本においては、1つもしくは2つの着色された標識を単純計数することができる。しかしながら、デジタル画像を処理し、かつそれらから数量データを抽出することができるという能力により、FISH技術には新たな膨大な可能性が追加される。本発明のような適当な撮像方法は、標識された染色体および遺伝子座を明確に同定できるように微弱なFISH画像を強化するこ

とができる。容易に達成可能な実験条件下で、標識された部位を自動計数することが可能である。また、各標識された部位を測定し、DNA量を計算して、例えば、特定の遺伝子の、存在する複製数を明らかにすることもできる。多色FISHのような新規技術はカラー画像分析を用いて多数(3, 4, 5およびそれ以上)の蛍光プローブを検出し、定量化する。

上述のように、FISHは標識されたプローブの位置、各染色体上の標識された部位の数、および各部位における標識の強度（遺伝子物質の量）に関する情報を提供することができる。動原体（反復DNA）プローブは各標的染色体に存在する複製を標識し計数するために用いられる。遺伝子座に特異的なプローブは遺伝子物質の小領域の位置をマップするために使用される。これらの型のプローブの双方は原型のままの相間核および有糸分裂染色体スプレッドに用いることができ、視覚的に計数可能である。これらは、特定の染色体、染色体断片、もしくは遺伝子の複製を過多もしくは過小に有することによって特徴づけられる遺伝子病を同定するために慣習的に使用される。ある種の癌のごく初期段階においては、細胞が異常と認識される前に、特定の遺伝子の数が増大する、当分野において遺伝子増幅と呼ばれる現象が起こることがあるが、これは遺伝子座特異性プローブの使用によって検出可能である。FISHを用いて癌性細胞中の染色体異常を検出すると、病気が到達した発達段階を指摘し、したがって、その多くの効果が段階に対して特異的な、最適の治療を選択することができる。したがって、貴重な時間を節約し、患者の苦痛を最小化し、最も効果的な、段階に特異的な治療を選択される。

1つの特定の染色体を（例えばフロー血球計算により）分離することによってその染色体の全表面を均一に標識し、これを（例えば音波処理によって）物理的にもしくは（例えばエンドヌクレアーゼによって）

酵素的に切断し、全片に対して1組のプローブを発生させることが可能である。全染色体プローブは染色体ペイントとしても知られており、標的染色体のすべての複製物を蛍光標識するものである。染色体ペインティングの重要な用途の1つはある種の癌で特徴的に起こるような2つの染色体間の欠損および転移の検出にある。

例えば、染色体Aが特異的に緑のペイントで標識され、染色体Bが特異的に赤のペイントで標識される場合、AからBへの物質のあらゆる転移は赤い染色体上の緑色領域（あるいは反対）として認められる。典型的には、正常な染色体から発生した染色体ペイントを用いて異常な（患者の）染色体の欠損もしくは転移を

検出する。逆染色体ペインティングは異常な染色体から発生したプローブを用いて、異常な染色体に物質を寄与した様々な正常な染色体に由来するDNAを同定する。

比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）は逆染色体ペインティングの変種であり、染色体の完全な組から2つのDNAプローブのカクテルを発生するものである。1つのカクテルは正常な1組の染色体から発生し、他は1組の異常な（例えば腫瘍）染色体から発生する。2つ組のプローブは異なるレポータ分子を用い、例えば、正常なDNAが赤い蛍光を示し、異常なDNAが緑の蛍光を示すようにする。正常な分裂中期のスプレッドは両カクテルで同時にハイブリッド化され、カラー画像分析を用いて評価される。赤よりも緑の蛍光が強い正常な染色体領域は、患者の異常な細胞中のその遺伝子でDNA増幅（多数の遺伝子複製）が起きたことを示す。緑よりも赤の蛍光が強い（緑／赤比の低下した）領域は、患者の染色体中の遺伝子欠損部位を示し、赤と緑の蛍光が同等である領域はその部位でDNAの変化が起こらなかったことを示す。CGHおよび関連する技術は従来の標識よりも複雑であるが、従来可能であったよりも、より微細かつ広範囲な遺伝子変化を検出かつ定量化するこ

とを可能にするものである。

上記の説明から、核型判定、転移／再配置検出、染色体欠損／増幅、および遺伝子マッピングが、単純なカラー蛍光画像の代わりに、比較的高分光解像度で全分光像を構築する本発明の感度の高い定量的な分光撮像方法によって、大いに利益を得ることがわかる。その理由は、このような方法がサンプル調製時間を短縮し、ハイブリッド化された蛍光プローブをバックグラウンドに残存するものから（小さな分光シフトによって）区別することを可能にし、極めて多数のプローブを同時に測定することを可能にするからである。

したがって、本発明の目的の1つは、プローブ技術における利点を活用するFISH撮像法を提供することにある。本発明によれば、任意の染色体分析において分析可能なプローブ数を大幅に増加させ、かつ従来技術の方法に比べて自動化の速度および程度を劇的に向上する。

本発明のFISH撮像法はスペクトラキューブ系の利点を活用するものであり、単一の実験で顕微鏡視野内の全ピクセルからの蛍光スペクトルを同時に得、数多くのプローブの位置を検出できるものである。染色体特異性プローブおよび新規の標識法が入手できることに関連して、これらの方法は異なった色（すなわち、ヒト核型については24色の異なった色）でペイントされた各染色体を有するFISH核型が形成可能である。これらの方法により、極めて高いサンプル処理能力が得られ、実質的に無制限の数のプローブについての分析が可能になる。

上述のように、本発明の主要な概念の1つはFISH分析に多くの蛍光プローブを使用することにある。FISHに用いられるDNAプローブを標識するためには、酵素反応を用いてビオチンもしくはジゴキシンのようなハプテンをDNAに組み込む間接法を含む、数多くの方法が利用可能である。有糸分裂染色体スプレッドもしくは間期核へのハイブリ

ダイゼーションに続いて、蛍光標識を免疫学的方法を用いてハイブリッドに付着させる。より近年には、蛍光染料は直接プローブに組み込まれ、中間ステップを用いることなく測定されている。標準的なFISH染料にはフルオロセイン、ローダミン、テキサスレッド、およびカスケードブルーが含まれ、多プローブ分析は異なるプローブを異なるハプテンもしくは蛍光染料で標識することによって達成される。

蛍光は発光の1形態であり、光子が、基底電子状態にある蛍光体と呼ばれる分子に吸収された後に生じるものである。電子がより高いエネルギー軌道に移る結果、分子は励起状態まで高められる。この余分なエネルギーは電子が当初の基底状態に戻るときに散逸し、光量子を放出する。蛍光は吸収光よりも波長が長い。このシフトは制限されており、発光は励起波長近傍で行われる。このため、ある分光領域で励起される蛍光体は類似した分光領域で発光する。例えば、励起が青色領域で起こる場合、発光は緑色と予想される。したがって、異なるスペクトルを発する数多くの異なるプローブを使用したい場合、それらは波長が近接してなければならず、多くの場合、重なり合っていることが明らかである。したがって、異なったプローブを識別可能とするためには、分光解像度が極めて重要である

。

本発明の方法によれば、各プローブに偽カラーが付与され、その情報はコンピュータ画面に表示される。多色蛍光の使用により、多数のプローブによって利益を受け得るFISHを重要な臨床用途にまで拡張する可能性が生じる。その例には異数性および染色体構造研究、標識染色体および完全なFISH核型の検出が含まれる。単一のハイブリダイゼーションによって多重情報が得られるため、処理能力が向上し、遺伝子投与効果の評価もしくは欠損の程度の測定のために内標準を用いることができる。

本発明の方法は白色光源もしくはコヒーレントな光源によって数個の狭い分光帯域で励起された蛍光、および冷却されたCCDを備えたセンサを用いるものである。したがって、各々異なったDNAプローブを表す多数のスペクトルを同時に測定することができる。このため、染色体の多数のスナップショットを撮影した後で画像を再構築する、時間がかかりかつ人工的な結果を生じる従来の方法に比べて画像取得の速度および精度が向上する。よって、本発明は、高感度、高速、かつ高精度に多数プローブの検出を可能にするため、従来の細胞遺伝学的撮像に対して顕著な進歩性を示すものである。

c. ミクロ環境変化の検出

(例えば、抗体に付着した際の) 蛍光染料の使用は特定の化学物質(例えばタンパク質)の存在を同定することに限定されない。また、ある種の染料は実際の化学的および物理的なパラメータをプローブするためにも使用できる。例えば、水素原子を獲得もしくは損失するとスペクトルが変化する染料はpHインジケータとして機能することができる。局所的電位、pHレベル、および細胞間濃度(例えばナトリウム、マグネシウム、遊離カルシウム等)は現在、様々な用途に用いられている。例えば、Tsien(1994), Chemical and Engineering News, 34, 34~44ページを参照されたい。

環境感受性染料の使用は、一般的な分析方法[Bright et al, BioTechniques 5, 556~563ページ]である比撮像に密接に関連する。今日使用されている染料のいくつかにおいては、分光範囲の一部においてのみ、環境に関連した分光変化

が起こる。2つの分光範囲における蛍光発光の

比を測定することにより、サンプルの厚さ、照明の不均一さ等に左右されずに環境の影響を調べることができる。

本発明の分光生物撮像方法は、2つ（もしくは3つの）別個の波長における蛍光を測定する従来の技術を用いることなく、完全なスペクトルを測定できるものであり、比撮像用途においていくつかの利点を有している。完全なスペクトルを測定することは比撮像の精度および感度を顕著に向上する。例えば、完全なスペクトルを用いて、2つの異なった分光範囲で2つの積分された強度の比を測定し、同時に、関連した分光範囲のみにおいて積分をおこなうことにより、すべてのバックグラウンド強度を除去することが可能である。また、測定された分光データをライブラリに保存された参照スペクトルに当てはめることによる関心のある環境パラメータを決定するような、より洗練されたアルゴリズムを分光データの分析に用いることもできる。分光分析は画像の各点で行われるため、（例えば、Rutenbergの米国特許第4,965,725号に記載されるように）サンプルの十分な形態学的分析が可能である。分光生物撮像はこのように、関心のある物理的および化学的パラメータをマップ（すなわち画像として表示）する能力を提供し、潜在的により画期的かつ効果的な研究を可能にするものである。

分光生物撮像技術を用いることにより、それ自体では他の比方法を用いる分析に適合しない環境感受性染料を使用することが可能になる。また、数種の環境パラメータ（例えば電圧およびpH）に感受性の染料の検出は適当な分析アルゴリズムを用いることによって達成できる。

スペクトラキューブ系を用いてマイクロ環境感受性染料の蛍光発光を検出する方法の1例を図6 a～dに示す。図6 aは有糸分裂期の細胞のRGB偽カラー画像を示し、有糸分裂細胞はアクリジンオレンジで染色されている。アクリジンオレンジは染料の形態によってその蛍光発光が変

化する線量である。単量体形態において、染料分子は溶液中で高度に希釈され（すなわち、低濃度となり）、蛍光極大は530 nm付近にある。これに対し、二

量体（および多量体）の蛍光は、濃縮溶液において典型的には640nmにピークを有する [W.T. Mason (編) (1993), Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Techniques Series, Sattelle編集, Academic Press社, Londonの第6章参照]。図6bは、図6aの分光像で測定された数千のスペクトルから選択された2つのスペクトルをプロットしたものである。スペクトルMはアクリジンオレンジが単量体である細胞質領域から選択されたものであり、スペクトルDはアクリジンオレンジが二量体である核領域から選択されたものである。これら2つのスペクトルは染色体上の点の蛍光発光（スペクトルD）および細胞の細胞質上の点の蛍光発光（スペクトルM）に対応する。アクリジンオレンジ染料は、アクリジンオレンジ分子とその周囲の化学的環境との間のエネルギー移動の結果として分光シフトを示す。図6cおよび6dは、アクリジンオレンジの単量体形（M）および二量体形（D）のスペクトルをそれぞれ参照スペクトルとして用いて行われた2つの類似性マッピング（上記参照）の結果を示すものである。このアルゴリズムは異なる形態の染料分子間の定量的識別を容易にし、したがって、細胞の構造および環境に関して付加的な知見を可能にするものである。図6cは図6bのスペクトルDを参照スペクトルとして用いた類似性マッピング分析の結果を示すものである。この分析により、調査された有糸分裂細胞の極に二量体形のアクリジンオレンジが蓄積し、ここで核酸の多くが濃縮されていることが明らかになった。図6dは図6bのスペクトルMを参照スペクトルとして用いた類似性マッピング分析の結果を示すものである。図6c～dに示した画像は、このように、単量体形のアクリジンオレンジ（細胞質内）および二量

体形のアクリジンオレンジ（染色体内）の蛍光によって分光差を強調するものである。したがって、本発明の方法は細胞成分によって誘発された蛍光シフト（すなわち投与されたプローブによって誘発された蛍光）を明らかにするのに極めて適している。

d. 天然含量からの自然蛍光の測定

葉緑素は自然（すなわち天然）蛍光を示す天然顔料である [Haliwell(1981),

Chloroplast Metabolism - the structure and function of chloroplast in green leaf cells, Clarendon, Oxford, U.K.]. 葉緑素の蛍光スペクトルは広範に研究されている。なぜなら、それは典型的な蛍光染料由来のスペクトルよりも複雑であり [Parson(1988), Photosynthesis and Other Reactions Involving Light, Biochemisry (Zubay編), 第2版, 564~597ページ, Macmillan, New York]、また、葉緑素自然蛍光は多くの用途で重要であるためである。例えば、葉緑素自然蛍光測定を用いて細胞代謝をプローブし、光合成を追跡することができる。また、自然蛍光はポルフィリン類、天然細胞質タンパク質および他の化合物でも起こる。細胞中の異なった部分の分光差を測定できるという分光生物撮像系の能力は生体細胞中の細胞小器官の機能に重要な知見を提供する。葉緑素分光撮像の1例を図7 a~dに示す。Oedogonium種の藻を蛍光顕微鏡法で検査した。励起は緑色分光範囲(540 nm)で行われ、赤色分光帯の発光をスペクトラキューブ系で測定した。図7 aは試料から発光された総蛍光を明らかにする。赤色葉緑素蛍光(右側)および試料中の細胞残部からの関連する緑色励起光(左側)の双方が明確に認められる。赤色蛍光を示す個々の藻細胞は部分的にしか見えない。試料の4つの異なるピクセルに由来する蛍光スペクトルを図7 eに示す。

発光ピークを685 nmに有するスペクトルAは赤色蛍光が支配的な中央の藻中の点から測定したものである。一方、スペクトルBは、ピークを542 nmに有する、緑色発光を示す細胞残部の点に対応する。スペクトルCおよびDは藻上の2つの付加的な点に対応する。図7 bに示すように、スペクトルAを類似性マッピング分析のための参照スペクトルとして用いると、残部で隠された藻の部分を含んで、藻中の葉緑素を正確に見出し、その比濃度を測定することができた。この偽着色された図は、葉緑素は、分散されているが、細胞の中心に位置していることを示している。図7 cは、画像中の赤色蛍光が微弱な点を参照スペクトルとして用いた類似性マッピング分析の結果である。これらから、異なる細胞部位で異なる葉緑素強度が存在すること、例えば、蛍光のいくらかは細胞膜の周囲で起こることが示される。したがって、類似性マッピングアルゴリズムを用いること

により、細胞中の特定の細胞下領域から発せられる特徴的な蛍光を可視化することもできた。図7 dは細胞残分に由来する緑色スペクトルを参照スペクトル（図7 eのスペクトルB）として用いた類似性マッピング分析を適用した場合の細胞残分のスポンジ状構造を強調するものである。また、この最後の分析は、緑色光を反射する藻の細胞壁を明らかにした。さらに、この類似性は、単細胞藻の位置も示した。

自然蛍光の研究は他の多くの用途を有している。例えば、自然皮膚蛍光の研究は、異なった組織成分および組織の組織学的機構に対応する「分光指紋」を同定した。組織分光指紋を用いて異常組織から正常なものを識別することは広範に研究されている。例えば、Marchesini et al(1991), Photochemistry and Photobiology 53, 77~84ページ; Bottirololi et al(1994), Lasers in Surgery and Medicine;および Profio(1984), IEEE Journal of Quantum Electronics QE-20, 1502~1506ページ

を参照されたい。このような医療診断用途における分光生物撮像の潜在的臨床有用性は顕著であると思われる。

e. 蛍光共鳴エネルギー転送

FRETは2つの蛍光体間の空間的分離を測定可能にする蛍光法である。FRETにおいては、「ドナー」および「アクセプタ」と呼ばれる2つの異なる蛍光体を用いられる。この1対の蛍光体は、ドナーが励起された場合、これが蛍光を発するか、その吸収したエネルギーを第2の蛍光体（アクセプタ）に転送して後者を蛍光発光させることができるように、注意深く選択される。したがって、発光スペクトルの違いからドナーとアクセプタとを識別することが可能である。

ドナーとアクセプタとの物理的分離は、エネルギー転送効率は2つの蛍光体間の距離に強く依存する（典型的には効率は分離距離の6乗の逆数に比例する）。これら2つの蛍光体を2つの異なる型の分子にもしくは2つの異なる状態にある同一の分子に付着させ、（顕微鏡に取り付けられた）分光生物撮像系を用いてFRETを測定すると、異なる分子（もしくは分子状態）を、それらの空間的分布を同時に測定しながら、識別する能力が容易なものとなる。エネルギー転送現象

に関する詳細な考察は当分野の文献に見出すことができる [Herman(1989), Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, パートB, 第8章, 219～243ページ, Taylor and Wang編集, Academic Press社; および Jovin and Arndt-Jovin(1989), Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry, 第5章, Academic Press社参照]。

FRETは3つのパラメータを測定することによって行われる。これらは(1) ドナー吸収ピークで励起された時のドナー発光ピーク強度、

(11) ドナー吸収ピークで励起された時のアクセプタ発光ピーク強度、および
(111) アクセプタ吸収ピークで励起された時のアクセプタ発光ピーク強度である。次いで、これら3つのパラメータを補正および分析して、検査中の2つの蛍光体の分離距離および位置を得る。

分光生物撮像系、特にスペクトラキューブ系を用いることにより、測定結果が向上するのみならず、測定が容易になる。実際、分光生物撮像法を用いることにより、励起がドナー吸収帯にある場合にはドナーおよびアクセプタ吸収帯の双方が同時に測定可能であるため、2回の測定しか必要とされない。

分光生物撮像法を用いることにより、FRET法をさらに発展させることができる。例えば、FRET用に、環境変化に感受性を有するアクセプタを選択し、分子距離測定と同時に、比撮像法を用いてミクロ環境変化をモニタすることができる。さらに別の例としては、FRETを2つの異なるアクセプタと共に用い、(異なる発光スペクトルで) 2つの分離距離および蛍光体位置に関する情報を同時に供給することができる。二重アクセプタ実験を従来の方法で行うのは極めて困難である。分光生物撮像の使用はFRET結果の精度を高め、実験手順を簡略化し、より強力な分析法を可能にすることができる。

透過顕微鏡法

光学顕微鏡法は生物学および病理学において細胞および組織を可視化するための最も基本的な技術である。透過顕微鏡法は細胞小器官および構造の細部の本質的に低いコントラストの影響を大きく受ける。このコントラストを改善するために数多くの方法が開発されており、それらには染色および空間フィルタリングが

含まれる。本発明の分光生物撮像法

の使用は、透過顕微鏡下で検査される細胞および組織の見掛け上のコントラストを増大させるための最も直接的な方法の1つであり、これによって、この一般的な顕微鏡的方法の同定および識別能力は劇的に改善される。ここで提案される基本的な手法は、分光像を測定し、次いで、この大量な情報を分光的および形態学的分析法およびアルゴリズムと共に使用して、細胞および細胞下の細部を同定かつマップしようとするものである。

生物学的試料の組織学的検査を促進するために、前世紀中に、細胞中の異なる巨大分子に特異的に結合する有機染色を用いる様々な染色技術が開発されたが、分子ベースの染色技術は今日まで経験的なものである。他の画像コントラスト強化法には暗視野および偏光法のような空間フィルタリング技術の使用が含まれる

[Kam(1987), Quarterly Reviews of Biophysics, 20, 201~259ページ参照]。最も一般的な染色技術はロマノウスキーゲームザ染色およびヘマトキシリン-エオシンである。ロマノウスキーゲームザ染色法は2つの染料を用いるもので、その1つはアズールB (トリメチルメチオニン)、すなわちチアジン染料であり、2つめはエオシンY (ヒドロキシキサンテンプロマイド) である。チアジンはカチオン性染料であり、したがって酸性細胞成分に結合する傾向にあり、エオシンはアニオン性染料であり、塩基性細胞成分に結合する傾向にある。これら2つの要素はいわゆるロマノウスキーゲームザ効果を形成すると広く認められており、この効果は、いくつかの染色部位で特定の紫色の新規な染料複合体の発達として発現される。アズールB-エオシン複合体の分子ベースは不明である。ある著者はアズールBがDNAのリン酸基のようなアニオン性構造に結合し、エオシンは同時にDNAの隣接するカチオン性部位およびアズールBの双方に結合すると考えている。より最近に提案されたアズールB-エオシン複合体のモデルでは、

フリードリッヒおよび同僚 [Friedrich et al(1990), Histochemistry 93, 247~256ページ] はアズールBが最初にDNA分子のリン酸ジエステル残基に結合すると示唆した。著者等はエオシン分子のフェニル基が(単一面に存在する)アズ

ールB分子に結合する部分であると仮定した。紫色はエオシン吸収ピークの赤色シフトの結果であり、これは結合したエオシンの誘電偏光によって引き起こされる。このようなアズールB-エオシン複合体の存在そのものは他者によって依然として疑問視されている[Friedrich et al(1990), Histochemistry 93, 247~256ページ; Bittiroli et al(1990), Lasers in Surgery and Medicine; Profio(1984), IEEE Journal of Quantum Electronics QE-20, 1502~1506ページ; Herman(1989), Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, パートB, 第8章, 219~243ページ, Taylor and Wang編集, Academic Press社; およびJovin and Arndt-Jovin(1989), Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry, 第5章, Academic Press社参照]。

どの技術でも、染色によって、細胞の細胞下区画を識別し、特に核内のクロマチン機構を識別することが可能である。ダークブルーに染色されたヘテロクロマチンとピンクに染色された真正クロマチンとの間の比は細胞切片中の細胞を評価する際の主要な決定因子の1つであることが確立されている。しかしながら、染色された試料から得られた結果は依然として、ある程度は、経験、技術、および主観的解釈の問題である。科学者の経験による効果を低減するため、有機染色と巨大分子との間の相互作用の分光特性を研究し、したがって、DNA染色のいわゆるロマノウスキーゲームザ効果を評価しようとする試みが行われた。

透過光学顕微鏡法に適用された分光撮像は細胞および組織の寸法、形状およびテクスチャ特性の定量的測定を大幅に向上することができる。

この技術は形態計測と呼ばれ、生物学および病理学において急成長している分野である [Erler et al(1993), Modern Pathology, 6, 612~618ページ]。形態計測分光像分析は微細な細胞学的および血液学的特性を評価し、診断的および予知的評価のための有用な超構造的および医学的情報を得ることを可能にする [Hytiroglou et al(1992), Cancer 69, 88~212ページ]。本発明の方法による分光生物撮像を用い、染色された組織における真正クロマチンに対するヘテロクロマチンの比を定量的に測定しかつ異なる細胞小器官を同定する能力は下記および実施例2で示される。

細胞生物学における分光生物撮像の利点は、この技術が所定の染色された細胞の分光的情報を点ごとに測定できることにある。細胞画像の各ピクセルは所定の点における透過光に関する正確な情報を提供し、これは直ちに吸収スペクトルに換算される。図8 aは血球用のメイ-グリンワルド-ギームザ法によって染色された血漿血球を示すものである。図8 bは細胞の様々な細胞下部位、および矢印で示された4つのスペクトルが収集されたピクセルを示す。ピクセルAはヘテロクロマチン、ピクセルBは青色染色された細胞質ゾル領域、ピクセルCは細胞質小胞、ピクセルEは細胞質ゾル中の点を示す。これらのスペクトル(A~E)はこの分光像中に存在する1万個のうちの5つに過ぎない。図9 aは細胞画像のこれら5つのピクセル由来の透過光スペクトルを示す。これらのスペクトルは入射照明光源について補正がされていない。真正クロマチンおよびヘテロクロマチンからの透過光は強度が低く、いくらかの分光差を示す(図9 aにおけるスペクトルAおよびCを比較されたい)ことが認められる。一方、細胞質ゾルから得た点のスペクトル(B)は特異的な変化、特に光強度差を示す。図9 bは細胞外で記録された入射光に相対的に計算された対応スペクトルの吸収を示す。染色された細胞中の

細胞下区間(A~E)は画像中に肉眼で認められる色範囲の起因となる分光特性を有することが認められる。しかしながら、肉眼は異なる着色巨大分子複合体をそれらの色に基づいて識別かつ分離するには能力が限られている。スペクトラキューブをベースとするシステムを本発明と組み合わせると、画像から選択されたスペクトルを、全画像を構成する他の1万個の異なるスペクトルと比較することが可能になる。したがって、画像の各点は選択された(すなわち参照)スペクトルに対する、あるレベルの類似性によって特徴づけられる。上述の類似性マッピングと呼ばれる数理アルゴリズムは元の分光像からグレーレベル画像を形成する。原則として、このアルゴリズム(および他の多くの類似したアルゴリズムが試験可能である)を用いることにより、選択された参照ピクセルと類似した特性を有する画像中のすべてのピクセルを見出すことができる。この技術は染色された細胞中の微細部を識別する肉眼の能力を高める。このような画像は特定の画像に

関連する定量的な結果として定義することができる。

図10 a～dは図8 aのスペクトルを用いて再構築した4つの定量的類似性マッピング画像を示すものである。図10 aは図9 aのスペクトルAを参照スペクトルとするマッピングで再構築された類似性マップである。核内の真正クロマチン領域の微細構造が顕著に強調されている。真正クロマチンネットワークが核の全部にわたって緊密に結合し、核膜の上部にまで及んでいることが検出できる。核の中心には特に明るい部位があり、核小体を示すものと思われるが、この推測は図10 cに示す類似性マップによって支持される。図10 bは図9 aの参照スペクトルBを用いて構成された類似性マップをしめすものである。この図では2つの主要な特性が認められ、これらは双方とも膜境界に関連する。その1つは細胞の中心にあり、他方は細胞外膜を画定するものである。新規

に形成された画像は、細胞質ゾルの中心の明るいアレーは大きなゴルジ複合体であるという考えを支持することができるものであり、この解釈は、ゴルジ領域を取り巻く周囲の液胞を示す図10 dの類似性マップによって支持される。図9 aの参照スペクトルCを用いたマッピング後の核ヘテロクロマチンを図10 cに示す。この画像は図10 aに示したものと補完的であるが、他方、核ヘテロクロマチンの様々な複合体間におけるいくつかの予期できない結合を示している。最後に、図10 dは、図9 aのスペクトルDおよびEを組み合わせたマッピングによって得られたものであり、細胞ゾル中の液胞構造、主として細胞質液胞を明らかにしている。驚くべきことに、この類似性マップは、細胞下区間を取り巻く別の膜である核膜を識別する。

これらメイーグルンワルドーギームザ染色された細胞の分光撮像結果に基づけば、各点（もしくはピクセルとして定義されるもの）は、数種のカテゴリに分類できるその特異的な吸収および透過スペクトルを有している。研究の現時点では、「紫色ロマノウスキーギームザ複合体」と呼ばれるものと高い相関を有することのできる分光成分を示すいくつかの兆候が存在する。ヘテロクロマチンの吸収スペクトル（図10 c）は明らかに540 nmにおいて顕著なピークを示しており、これは「紫色ロマノウスキーギームザ複合体」と記載されたものと良好に対

応する [Friedrich et al(1990), Histochemistry 93, 247~256ページ; Bittir
oli et al(1990), Lasers in Surgery and Medicine; Profio(1984), IEEE Jour
nal of Quantum Electronics QE-20, 1502~1506ページ; Herman(1989), Fluore
scence Microscopy of Living Cells in Culture, パートB, 第8章, 219~243
ページ, Taylor and Wang編集, Academic Press社; および Jovin and Arndt-Jov
in(1989), Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry, 第5章
、Academic Press社

参照]。分光的な細胞質特性(図9aのスペクトルB)は類似性マッピングに用
いられると、核膜、ゴルジ槽、細胞質液胞、および細胞外膜を示すと考えられる
成分を明確に識別することを可能にする。しかしながら、染色された細胞は、空
気中で乾燥されると、細胞質層の重なりを招き、これによって見掛け上の解像度
が低下することがある。細胞の特定の深さに集中し、したがって、この技術の可
能性を顕著に向上することのできるアルデヒド固定細胞の使用が、分光撮像をさ
らに発展させるために、示唆される。

ある場合には、透過法および未染色組織を用いて得た分光像が、蛍光顕微鏡技
術によって見出されるものと類似した情報を提供することがある。分光蛍光生物
撮像と透過顕微鏡法とを組み合わせることの利点の1つは、「クリーンな」測定
技術が使用可能であること、すなわち、潜在的に毒性の染料もしくは固定剤を使
用する必要がないことにある。

したがって、本発明によれば、高い空間および分光解像度を特徴とする分光生
物撮像法が提供され、この方法は、(a) 分光撮像されるべきサンプルを調製す
る工程、(b) そのサンプルを光学装置を通して観察する工程、この光学装置は
撮像分光計に光学結合されており、光学装置および撮像分光計は、(i) コリメ
ート光学要素を用いてサンプルの全ピクセルから入射光を同時に収集し、(i i
) コリメートされた入射光を多数の要素を有する干渉計系に通し、まず、光が干
渉計内部で異なった方向に進行する2つのコヒーレント光線に分割され、次いで
2つのコヒーレント光線が再結合されて互いに干渉して出射光線が形成されるよ
うにし、(i i i) 出射光線を、検出器要素の2次元アレーを有する検出器上に

出射光線を収束させる収束光学系に通し、各時点で検出器要素の各々がサンプルの1つの、全測定期間を通じて常に同一のピクセルであり、サンプルの実像は検出器アレー面上で固定され、測定中のあらゆる

時点で像は可視かつ識別可能であり、各検出器要素は、異なる波長でピクセルから発せられる光の強度の特定の一次結合である信号を生成するようにし、この一次結合は瞬時光路差の関数とし、(i v) 干渉計系の少なくとも1つの要素を回転し、干渉計系によって生成された2つのコヒーレント光線の間の光路差がサンプルの全ピクセルについて同時に走査されるようにし、(v) 記録装置を用いて各検出器要素の信号を時間の関数として記録し、データの第1のキューブを形成することによってサンプルの各ピクセルのスペクトルを得るためのものである、および(c) 数値アルゴリズムを用いて第1のキューブを解釈する工程を含む。この方法はさらに(d) 解釈されたデータのキューブをマップする工程を含んでもよい。光学装置は上述のいずれのものであってもよいが、これらに限定されるものではない。コリメートされた光はサンプルの透過光、反射光、散乱光、もしくは発光光とすることができる。サンプルの発光光は投与されたプローブの蛍光、投与されたプローブに誘発された蛍光、もしくは自然蛍光とすることができる。光はいかなる供給源に由来してもよく、例えば、レーザ、白色光、濾過光、紫外光および/もしくは小さな波長範囲を有する光等、いかなる型のものであってもよい。光は複数の光源に由来するものとすることもでき、光源は同時または順に作動させることができる。二次元アレーはビデオ級のCCD、冷却高ダイナミックレンジCCD、増感CCDもしくは時間ゲート増感CCDとすることができる。サンプルは、細胞、組織、もしくは全生体等、あらゆる生物学的サンプルとすることができ、ヒトを含むいかなる種に由来するものであってもよい。細胞はパップ塗末で収集された細胞、血球、胎児細胞、悪性の疑いがある細胞、分裂間期中の細胞、有糸分裂中の細胞もしくは減数分裂中の細胞を含むいずれの型の細胞であってもよい。組織は、眼の網膜、網膜血球、腫瘍、皮膚、角膜、毛髪、肺、胃、腸、

膀胱、結腸、前立腺、頸部、動脈、静脈もしくは心臓を含むいずれの型であってもよい。

さらに、本発明によれば、サンプルは細胞、組織切片もしくは生体とすることができ、光はプローブによって誘発され、プローブは特定の細胞成分に結合するものとする、本方法はその細胞成分の存在もしくはレベルを検出するためのものとなる。プローブは共役蛍光残基を含むことができ、誘発されるのは蛍光残基の蛍光発光である。プローブはさらに、デオキシリボ核酸および／もしくはリボ核酸のような核酸分子を含んでもよく、この場合、本方法は細胞の核酸分子とのハイブリッド化の存在もしくはレベルを検出するために用いられる。また、プローブは抗体を含むことができ、この場合、本方法は、抗体によって認識される細胞タンパク質の存在もしくはレベルを検出するために用いられる。蛍光残基は生物学的用途に用いられるいかなる蛍光残基であってもよく、当業者に理解されるように、生物学的用途に用いられる未発見のいかなる蛍光残基をさらに含んでもよい。

数値アルゴリズムは上述のアルゴリズムから選択することができ、また、上述のアルゴリズムのいかなる組み合わせであってもよく、また、当業者に理解されるように、数値アルゴリズムは分光像を分析および／もしくは表示するのに適した現在既知もしくは未開発のいかなるものであってもよい。

本発明の方法はサンプルに投与された複数の蛍光体の分光的同定のため、例えば、制限されるものではないが、サンプル中の局所電位差、pH値および細胞内イオン（例えば、水素、ナトリウム、マグネシウム、亜鉛およびカルシウム）濃度のようなマイクロ環境変化を検出するため、サンプル中の葉緑素、ポルフィリンおよび／もしくは細胞質タンパク質のような天然成分からの自然蛍光を測定するため、サンプル中の少なく

とも2つの蛍光体間の空間分離を測定するための蛍光共鳴エネルギー転送を測定し、例えば、制限されるものではないが、サンプル中の細胞の核内のクロマチン機構の型のような細胞および細胞下細部を同定かつマップするため、時間の関数としてサンプル中の生命過程をモニタするため、インシチュでの染色体ペインテ

ィングを含むインシチュハイブリダイゼーションにおける蛍光のため、および細胞分類のために用いることができる。

次いで、上記の説明と共に本発明を示す以下の実施例を参照する。

実施例1

類似性マッピングアルゴリズムを使用した、藻を与えたゾウリムシの消化サイクルの分光撮像分析

この実施例は、細胞の生命サイクルの異なった時点で数個の分光キューブを測定しかつ、各試験時において、細胞中の特定の化学物質もしくは小器官の位置を類似性マッピングで強調することによって行われる分光撮像が、いかに細胞の生命過程を明らかにするかを示すものである。したがって、これは、時間の関数として、細胞の小器官の間の運動もしくは化学的変化、エネルギー交換、もしくは代謝反応を明らかにする。本発明がなぜ生命過程の研究に理想的であるのは、高い解像度および感度で測定を行うことにより、細胞および組織を特徴づける小さな化学変化を容易に追跡することができ、これらの変化は生命過程自体に関連しているからである。

図11a～dはゾウリムシ (*Paramecium vulgaris*) の4つの別個の細胞部位 (すなわちピクセル) における葉緑素の2つのスペクトルを示すものである。蛍光顕微鏡 (オリンパス社のBH2

RFC) に取り付けられたスペクトラキューブシステムを使用して生体ゾウリムシを分析した。ゾウリムシ細胞は緑色光源 (バンドパス極大545nm) で励起し、赤色蛍光をこのシステムで測定した。スペクトル1および2では630nmおよび695nmにおける蛍光ピークがわずかに異なっていることが認められる。これら2つのピークの相対強度はスペクトル3～6に示されるように細胞内の局在性の関数として変化する。

ゾウリムシに摂取された藻の未加工の葉緑素自然蛍光像を図12aに示す。ゾウリムシ細胞質中にはわずかな赤色葉緑素蛍光強度の変化しか認められない。上記の類似性マッピングアルゴリズムを使用することにより、ある程度の分光分化を示す細胞構造を表示することが可能となった。他のすべてのピクセルとの比較

の基準となる、ゾウリムシ細胞（図11a）の周辺および中心から選択された5つのピクセルの蛍光スペクトル、およびその結果を5つの異なる強調画像で示す。これらスペクトルの各々は類似性マッピングによって他のすべてのピクセルスペクトルと比較した。これらの結果を図12b～fに示す。

図12bに示すように、図11aのスペクトル1を参照として用いる類似性マッピングにより、ゾウリムシ上部に2つの別個の（白い）領域が明らかになった。これらスペクトルは高い含有量の天然藻葉緑素を明示し、したがって、おそらく細胞咽頭および口腔前庭を示すものである。図12cに示すように、図11aのスペクトル2を参照として用いる類似性マッピングにより、細胞咽頭および細胞質ゾルに隣接して、移動液胞を示す各々約1ピクセルの小さなスポットが明らかになる。図12dに示すように、図11bのスペクトル3もしくは4を参照として用いる類似性マッピングにより、細胞質の中間部に、630nmの低いピークによって特徴づけられる、減成した藻からなる大きな液胞が明らかとな

った。図12eの画像は図11cのスペクトル5を参照として用いる類似性マッピングによって得られたものであり、図12dのものと同一の区間に、ほぼ同一の630/695比を示す狭く画定された領域を明らかにした。したがって、図12eは同一のファゴリソソームによる藻の減成の進行した段階である。図11dのスペクトル6を参照として用いる類似性マッピングによって得られた図12fの画像は、外薄膜系近傍に大きな領域を明示しており、これはおそらく消化された老廃物が細胞から除去される細胞肛門を示すものである。このような老廃物は天然藻葉緑素の含量が最低であり、フェオフィチン含量が最大である。

図13は交配する2つのゾウリムシの藻周辺液胞に生息する藻共生体の赤色蛍光スペクトルを明示する。スペクトル1および2は、それぞれ、結合するゾウリムシの上部および下部の液胞に由来する。これら2つのスペクトルは高い630nmピークおよび低い695nmピークを示す。増大した695nmピークを有する同一のスペクトルが、藻周辺液胞のあらゆるピクセルにおいて、細胞中のいかなる部位も分光変化させることなく、記録された。図14aは図13のスペクトル1を参照として用いて、交配するゾウリムシ中の藻周辺液胞および天然藻葉

素含量の類似性マッピング画像を明らかにする。ゾウリムシの有性交配は、一般に体の口腔領域に付着するタイプ I およびタイプ I I の2つの交配細胞の付着によって始まる。図14bに示す2つの細胞は、図13のスペクトル2を参照として用いてマップされた、一方が他方よりも大きな藻周辺液胞を含有するもので、それぞれタイプ I およびタイプ I I 細胞に対応する [Morris et al (1994), Appl Spectroscopy 48, 857~866]。図13の低蛍光強度スペクトル3を類似性マッピングの参照として使用すると、図14cに示すように、2つの交配細胞の細胞質を見ることができる。葉緑素分解の欠如はこれらの細胞中の藻の共生体状態を明示する。

よって、実施例1は、適当なアルゴリズムと組み合わせられたフーリエ変換多ピクセル分光法によって単一生体細胞からの分光情報が明らかにできることを示す。

空間情報は蛍光強度および全スペクトルの点毎の情報の双方を明らかにし、これらの情報によれば、類似性マッピングアルゴリズムを用いて局所的生化学情報を明らかにすることができる。従来のマイクロ蛍光光度法を用いたり、狭いバンドフィルタを用いた場合には、ピクセル毎の情報は容易に得られなかった。交換可能なフィルタに基づいた比撮像は、容易に得られない主要な分光情報を必要とするため、本質的な制限を有している。もう1つの制限は、少数の適当なフィルタを調節する必要性である。このように、フィルタをベースとした撮像はサンプルの波長および空間依存性の強度を容易に得ることのできるものではない。一方、分光撮像用の回転フィルタ装置は生物学的方法には適当でない [Morris et al (1994), Appl Spectroscopy 48, 857~866]。プリズム光学分光法と組み合わせた共焦点走査レーザ顕微鏡法 [Trepte et al (1994), J. Microscopy 176, 238~244] はピクセル分光情報を明らかにする能力を有しているが、多ピクセル分光情報に基づく類似性マッピングおよび画像再構築のためには現在まで開発されていない。

この実施例では、単一の生体細胞において区分化された葉緑素減成過程を可視化するためにフーリエ変換多ピクセル分光法を適用した。ゾウリムシの食物サイ

クルの生化学は2つの主工程からなり、その1つはあらゆるエンドサイトーシス性小胞の一般則として、摂取物を液胞内へのプロトンポンピングによって酸性化することである。次の工程では、エンドサイトーシス性小胞とのリソソーム融合によって、加水分解性酵素がエンドサイトーシス性小胞を加水分解するエンドリソソームを形成する。低pHと加水分解性リソソーム活性によって、図15（分子Aおよび

分子B）に示すように、天然葉緑素はフェオフィチンに減成する。葉緑素からのマグネシウムの喪失は630nmから695nmへの分光蛍光シフトの根拠である。さらなるリソソーム酵素の加水分解活性により、テトラピロール環を開き、蛍光性のない鎖状構造を形成する（図15の分子C）。これら3つの状態は上記に示されており、このような変化が生じた細胞部位の位置を明らかにした。分光情報を使用すれば、天然葉緑素およびフェオフィチンの部位および、減成サイクルの終端を示す低蛍光部位の位置を明らかにすることができた。

葉緑素もしくはフェオフィチンの同定可能ないずれかのスペクトルの分光マッピングおよび画像再構築によって得られた画像は生化学過程の空間情報および決定された場所を含んでいる。したがって、本発明の方法を使用する分光像分析は、酵素反応中に分光変化が起こる生体細胞中における代謝過程を明らかにするために理想的である。

実施例2

骨髓正赤芽球および巨赤芽球におけるクロマチン縮合：多ピクセル分光分析および類似性マッピングによる撮像

血球の標準的な分析は、アズールBおよびエオシン染料を用いるメイーグルンワルドーギームザもしくはロマノウスキ法のいずれかによる染色に基づく。分光マイクロ分析は従来の方法で染色された細胞から得られるデータを強調することが認められた。すなわち、分光サブトラクション法を用いて、ガルブレス等（Galbraith et al）は様々な細胞構造の識別着色が染料成分の割合変化によって説明できることを示した [Galbraith et al(1980), J-Microsc. 119(3):313~30]。フリードリッヒ等（Friedrich et al）はロマノウスキギームザ染色された

細胞核は、い

わゆるロマノウスキ帯と呼ばれる、染料複合体の発色団に由来する、鋭く強い吸収帯を552nmに有していることを示した。他の吸収帯はDNAに結合したアズールBのカチオンに由来するものとされた [Friedrich et al(1990), Histochemistry 93(3):247-56]。エオシンのアニオンは主に疎水性相互作用によって電気的中性のDNA-アズールB複合体のアズールB骨格に結合する。エオシン吸収はエオシンと電気的中性のDNA-アズールB複合体のアズールB骨格との相互作用によって赤色シフトする [Friedrich et al(1990), Histochemistry 93(3):247-56]。核クロマチン粒度のコンピュータ化された分光マイクロ分析を用いることにより、スピナ等 (Spina et al) は良性および悪性乳房細胞の間の顕著な区別を明らかにした [Spina et al(1992), Virchows-Arch-B-Cell-Pathol 62(2):119-24]。この方法の原理は、メイ-グルンワルド-ギームザ法で染色された塗末の粗さのパラメータとして、真正クロマチックからヘテロクロマチック巣への高いコントラスト勾配の急激な変化の分析に基づいたものである。この方法においては、コンピュータに援助された2つの画像ローパスフィルタの間のサブトラクションが用いられ、したがって、デジタル化された画像上には高コントラスト勾配の値しか保持されなかった。

赤血球前駆体の成熟中、核および膜の双方は一連の定性的形態変化を示す。赤血球系列のうち、最も初期に認識可能な要素である前赤芽球は、一般に原始細胞を特徴づける、細胞質好塩基性、仁、微細な網状もしくは点状核クロマチンおよび大きな細胞寸法を有している。前赤芽球は一連の有核細胞を生じ、赤芽球は縮合度が増大する核クロマチンを漸次発達させて、仁および細胞質好塩基性を失い、増加するヘモグロビン含量を得る。このシーケンスは任意の段階に分割されるが、それらは通常3段階、すなわち (I) 好塩基性もしくは初期赤芽球、あるいは正赤芽球

A、(II) 多染色性もしくは中間赤芽球あるいは正赤芽球B、(III) 正染色性もしくは後期赤芽球、あるいは正赤芽球C [Hayhoe and Flemans (1992) He

matological Cytology, 第3版、11ページ、Wolfe Publishing社、London]。正染色性正赤芽球は小型で核濃縮性であり、その細胞質はわずかに多染色性である。前赤芽球もしくは正赤芽球のいずれかの核成熟異常は、ビタミンB12もしくは葉酸欠乏、骨髓異形成、化学療法効果等、様々な状況で観察される。

この実施例の目的は本発明の方法と組み合わされたスペクトラキューブシステムがヒト赤血球新生骨髓細胞の核から多ピクセル分光情報を得、かつクロマチン縮合と分光データとを相関させることができることを示すことにある。すなわち、核クロマチン構造と識別化との間の相関は、核の幾何学性および空間的配置に左右されず、分光的基盤によって可能になるであろう。

メイーグルンワルドーギームザ染色された赤芽球の多ピクセルスペクトルを分析した。典型的には単一の細胞から、各々細胞の異なる細胞部位（すなわちピクセル）を示す10⁴個のスペクトルを得た。各ピクセルについて2組の相補的データ、すなわち透過および吸収スペクトルを得た。図16aおよび16bはそれぞれ単一の細胞の5つの異なる細胞部位（すなわちピクセル）の透過および吸収スペクトルを示すものである。スペクトルAはヘマトクロマチン、スペクトルBは真正クロマチン、スペクトルCは細胞質小器官（すなわち青色細胞質）、スペクトルDは細胞質（すなわちピンク細胞質）、スペクトルEはゴルジ装置のものである。異なる赤血球分化細胞に由来する細胞核の透過スペクトル（例えば図16aのスペクトルA）は類似したパターンを呈する。すなわち、図16bのスペクトルAに示すように450~700nmの領域に低い光透過率を有すると共に、吸収極大を550および570nmに備えてい

る。550nmの鋭い吸収ピークはいわゆるロウマノスキーDNA複合体に関連付けることができる。このように、細胞下レベルで特異的な分光の詳細が得られた。赤血球細胞中の真正クロマチン（例えば図16aおよび16bのスペクトルB）は550~720nmの分光領域で高い緑色および赤色光透過能力および吸収を示した。これらの一般的な特徴的分光の外観は核部位毎に異なっていた。

細胞染色結合属性は異なったパターンを示した。すなわち、一般に高い光透過能力および青色シフトした吸収スペクトル（例えば図16aおよび16bのスペ

クトルCおよびD)を示した。ゴルジ様領域(図16aおよび16bのスペクトルE)および他の細胞質アレーは局在化された分光パターンを明らかにした。

図17a~pに示すように、真正クロマチン、ヘテロクロマチンおよび細胞質成分のスペクトル(それぞれ図16aのスペクトルA, B, C)を赤血球新生の4段階(すなわち赤血球の分化)を代表する4つの細胞の元画像の残りの10⁴個の細胞との類似性マッピング分析のための参照スペクトルとして使用した。上述のように、類似性マッピング関数は1つの選択されたスペクトルの面積積分と分光キューブの他のスペクトルとの間の差を計算する。再構築された画像はグレースケールに対応して明るさの変化したピクセルからなり、2つの間の類似性の程度を明示する。すなわち、この実施例では、ピクセルが明るいほど、2つのスペクトルはより類似している。図17a, 17e, 17iおよび17mはそれぞれ前赤芽球、好塩基性正赤芽球、初期赤芽球、および後期赤芽球の元RGB画像を示すものである。元RGB画像を調べることにより、変化はないが、4つの異なった赤芽球細胞間で核寸法がある程度見える(図17mと17iを比較されたい)ことに着目されたい。図17b, 17f, 17j, 17nは、図16aのスペクトルBを参照スペクトル

として用いたもので、真正クロマチンの核アレー(白色領域)を明示する。図17c, 17g, 17k, 17oは図16aのスペクトルAを参照スペクトルとして用いたヘテロクロマチン類似性マッピングの結果であり、真正クロマチンの核アレー(白色領域)を明示する。検査された細胞は、真正クロマチンの量が減少し、ヘテロクロマチンの量が増加するにつれて、より分化することに着目されたい。さらに、検査された細胞における真正クロマチンおよびヘテロクロマチンの配置を比較(例えば図17fおよび17gを比較)すると、相補的画像が明示されることに着目されたい。前赤芽球の真正クロマチンおよびヘテロクロマチン画像(それぞれ図17bおよび17c)は、主要な核流域が、互いに結合していない小パッチとして配置された染色真正クロマチン複合体からなることを明示する。図17fおよび17gは好塩基性赤芽球を示す。真正クロマチンの分光マップはヘテロクロマチンと比べて(図17fを図17gと比べて)、領域寸法、縮合

、および分布において前赤芽球に対する顕著な相違を示す。初期および後期赤芽球の分化に伴う核形態およびクロマチンパッケージングの変化を図17 j, 17 k, 17 n, および17 oに示す。後期赤芽球の真正クロマチン（図17 n）およびヘテロクロマチン（図17 o）画像はクロマチンの葉への最大縮合を示すことに着目されたい。図17 b, 17 f, 17 j および17 nに示すように、真正クロマチン画像は核膜をも検出した。図17 d, 17 h, 17 l および17 pは、細胞質参照スペクトル（図16 aのスペクトルD）への類似性マッピングによって得られた。細胞質液胞（例えば、ゴルジ装置、図16のスペクトルE）は類似した分光染色描写をしめした（図示省略）。これらの像はゴルジ様構造および細胞の外側境界を示す。

したがって、スペクトラキューブおよび本発明による類似性マッピングアルゴリズムを用いた分光画像分析および分光マッピングは、核分裂

に先だって行われるクロマチンの染色体アレーへの漸進的縮合を解明した。この分光撮像方法は縮合された染色体アレーおよびそれらの境界の微小な変化を強調するのに理想的である。初期および後期赤芽球の高度に縮合されたクロマチン領域の鋭い境界は他の核質とは特異的に区別された（図17 k および17 o）。これらの構造は個々のまたはグループ化された染色体の特異的機構に対応する可能性がある。

スペクトラキューブを本発明の方法と組み合わせて使用することにより、このように、健康な組織で起こる発展的变化をモニタすることが可能になった。また、様々な悪性腫瘍は独自の発展性によって特徴づけられるため、スペクトラキューブシステムおよび本発明の方法を用いてこれらの特徴をモニタし、したがって、例えば、このような悪性腫瘍の（例えば存在および段階を）早期診断することが可能である。

実施例3

黒色腫の5-アミノレブリン酸を介した光力学療法：類似性マッピングアルゴリズムを用いたスペクトラキューブ分光撮像システムによって測定された光増感剤相互作用

悪性黒色腫の光力学療法（PDT）は部分的にしか理解されていない [Marcus (1992), Photodynamic Therapy-Basic Principles and Clinical Applications, HendersonおよびDougherty編集, Marcel Dekker, New York, 219～268ページ]。腫瘍の着色の程度と退行の程度との間に強い相関が認められ、明るい腫瘍は暗い腫瘍よりもはるかに良性である [Nelson et al (1988), J Nat. Cancer Inst., 80, 56～60]。ヒトの着色された黒色腫はPDTには満足に反応せず、（例えば虹彩の）メラニン欠乏性黒色腫が陽性に反応すると結論づけられた [Favilla et al,

(1991) Br. J Ophthalmol., 75, 718～721]。一方、皮膚病変に対する5-アミノレブリン酸（ALA）誘発PDTの顕著な効果およびALAを介した実験的な黒色腫PDTの結果 [Malik et al (1987), Biol. Cell, 60, 33～40] は黒色腫PDTのは発展に新たな可能性を開いた。白血球細胞中で天然前駆体5-ALAから生合成されたプロトポルフィリン（PP）は、たとえ低光量でも癌細胞破壊のための効果の高い光増感剤であることが示された [Malik and Lugaci (1987) Brit. J. Cancer, 56, 589～595; Malik et al (1989), J. Photobiol. Photobiol. Photochem. B, 4, 195～205; およびHanania and Malik (1992) Cancer Lett., 65, 127～131]。5-ALA-PDTはヒトに適用して、特に基礎細胞腫のような皮膚癌ならびに内部充実性腫瘍の選択的根絶に成功した [Peng et al (1992), Int. J. Cancer, 52, 433～443]。局所的な5-ALA-PDTの適用もしくはその全身系注射は腫瘍の画定およびその光破壊の双方において高い選択性を示すことが示された [Kennedy and Pottier (1992), J Photochem. Photobiol. B., 14, 275～292; およびPeng et al (1992), Int. J. Cancer, 52, 433～443]。これらの結果は急速に分裂する変形細胞における周囲の正常組織に比べて顕著に高められたPP生合成および蓄積に直接起因するものである。5-ALA-PDTは選択的腫瘍治療のための安全かつ強力な道具であると考えられており、その目標の1つは黒色腫用にそれを開発することである。B16黒色腫細胞におけるPP生合成の刺激は、効率的な光学的殺細胞を容易にするためのポルフィリンの化学的誘発剤によって顕著に増強される

ことが示された [Malik et al(1987), Biol. Cell, 60, 33~40]。

本実施例で明らかになったのは、外因性PPによる治療に比較した、内因性PPを蓄積する単一の細胞上での主要な光化学過程および光力学

的反応である。PP蛍光の分光像分析によって、1つの細胞における多数のピクセル変化が明らかになり、少なくとも 100×100 (すなわち10,000)の異なるスペクトルが単一の細胞から得られた。分光撮像および類似性マッピングを用い、以下に示すように、単一細胞中の点分光変化および細胞間光増感標的の位置を見出すことが可能であった。

この目的で、ネズミ黒色腫細胞、ラインB16クローンF10を、10%ウシ胎児血清および抗生物質を添加したRPMI-1640培地 [Malik et al(1987), Biol. Cell, 60, 33~40]、組織培養プレートもしくはテルマノックス (Thermanox) カバー片 (Nunc, Naperville IL) で、5%のCO₂を含む湿気のある37℃の雰囲気中で培養した。移行のため、細胞はトリプシンEDTAで脱離させ、1週間に2回再培養した。黒色腫B16細胞による内因性PPの刺激法は(1)誘発段階およびそれに続く(2)生合成段階からなるものであった。誘発期は細胞をDMSOで48時間処理することによって達成した。これに続いて、段階(2)すなわち5-ALA (0.3mA)との血清欠乏培地中での24時間のインキュベーションを行った。5-ALA-培地のpHは7.0に調節した。段階(2)後、細胞はペレット化し、PBSですすぎ、ポルフィリン抽出を下記のように行った。外因性ポルフィリンを用いた試験のためには、プロトポルフィリンIX (Sigma)を1NのNaOHに溶解し、磷酸緩衝液中で10mMまで希釈し、24時間、黒色腫培地に添加した。局在化実験のためにフォトフリンII (QLT)についても同じ処理を行った。

黒色腫B16細胞は上記のようにDMSOおよび5-ALAの作用によってポルフィリンを蓄積しており、これに対して320~450nm発光で極大が380nmのフィリップス「黒色光」源を用いて1~5時間の照射を行い、20W/m²とした。細胞は1~4kJ/m²の光量で

照射された。照明は量子ラジオメータ光度計 L I - 1 8 5 型 (Lambda Instrument Corp., NE, USA) によって測定した。

B 1 6 黒色腫細胞内の光増感中における内因性プロトポルフィリン (内因性 P P) の細胞下局在化を本発明の方法によってスペクトラキューブシステムで分析した。黒色腫細胞は A L A と共にインキュベートし、次いで、個々の生体細胞中の内因性 P P の蛍光を 3 つのモードで記録した。これらは (1) 従来の蛍光像、(2) 100×100 ピクセルの蛍光分光像、および (3) 分光類似性マッピングを行い、点スペクトル情報から画像を再構築することによって形成された処理画像である。図 1 8 a に示すように、生の蛍光像は細胞質ゾルの全域にわたって内因性 P P の小胞分布を明示した。内因性 P P 局在化のこのパターンはミトコンドリアおよびリソソームならびに内質網状槽の蓄積を反映している可能性がある。これらの細胞内小器官は光増感中の主標的であることが示された。図 1 9 a は、それぞれ図 1 8 a に示した細胞の異なる細胞部位に由来し、各々 1 つのピークを 635 nm に、もう 1 つのピークを 705 nm に有する 4 つの蛍光スペクトルを示す。これら 2 つのピークの相対強度は、処理された細胞の細胞内区間における部位の位置によって変わるものではなかった。図 1 9 a (実線) に示す 1 つの蛍光スペクトルは図 1 8 z の細胞の 1 つの小胞から選択された。図 1 8 d の画像は、選択されたスペクトル (図 1 9 a の実線) を参照として用いた類似性マッピングで再構築された。図 1 8 d に示すように、再構築された画像は、膜および小胞蛍光の区分を明示した。図 1 8 d に示すように、1 分間の光照射中に、細胞中の内因性 P P は漂白され、蛍光強度は低下し、図 1 9 b に示す別の測定スペクトルは 625 nm および 670 nm への左方向のシフトを明示した。これら 2 つのピークの間の強度比は細胞中の部位毎に雑多な状況を明らかにした。図 1 9 b の実線スペクトルを用いた類

似性マッピングは、図 1 8 d に示すものと基本的に同様な、図 1 8 e に示す新たな像を形成した。図 1 8 c に示すように、長い照射間隔 (3 分) の後に、細胞の蛍光像は顕著に影響を受けた。図 1 9 c に示すように、図 1 8 c の細胞の 2 つの異なる点から得たスペクトルは $650 \sim 670 \text{ nm}$ に 1 つのピークを有していた

。蛍光像（図18c）もしくは図18fに示したものは図19cの実線で示すスペクトルを参照として用いた類似性マッピングに由来した画像であり、鮮明な小器官構造は認めることができず、これは細胞破壊の結果であると考えられる。したがって、分光変化は2つの主因を示すことができた。その1つは光増感の最も可能性の高い結果としての細胞下レベルでの光生成物の形成 [Konig et al(1993), J. Photochem. B:18, 287~290] であり、他方、光照射中のpH変化の可能性も排除できない。

異なった細胞下区間で生合成され、ミトコンドリアに蓄積された内因性PPは本実施例により、親水性環境に保持されることが明らかになった。光照射は2つの効果、すなわち、いくつかの光生成物の形成およびマイクロ環境におけるpH変化を生み出した。疎水性、親水性、酸度等のマイクロ環境の光生成物形成に対する効果および寄与 [Konig et al(1993), J. Photochem. B:18, 287~290] は単一の生体細胞のマイクロ蛍光分光法では分離することが困難である。

極めて異なる細胞内区間局在化が富血清培地において外因性PPでインキュベートした単一細胞内で可視化された。図20aは核周辺領域における外因性PPの蛍光像および特異的局在化を示し、これはおそらくゴルジ複合体および核膜を網羅するものである。また、蛍光は細胞質ゾルの他の部位でも認められ、外膜でもわずかに認められた。図21aに示すように、図20aに示した細胞の5つの異なるピクセルのスペクトルは、ピクセル毎に変化せず強度のみが異なる2つの固有な特徴的蛍光

ピークを明らかにした。主蛍光ピークは670nm、他のピークは625~630nmに位置することが認められる。図20bに示すように、外因性PPの1分間の光増感により、即座の損傷および再局在化が誘発された。中央に配置された外因性PPは核膜を取り巻く全般的な円形配置に変化した。4つの個々のピクセルに関する図21bに示すように、630nmは完全に消失し、蛍光は650~670nmにシフトした。4つの個々のピクセルに関する図21cに示すように、暗所における追加の5分間の後インキュベーションによって、蛍光の部分的な回復が認められた。新たなスペクトルは異なる細胞下部位において2つのピーク

を630および670nmに示した。

よって、これらの結果は、富血清培地に添加された外因性PPがエンドサイトーシスを介して摂取され、エンドサイトーシス-エンドソーム経路を通過してゴルジ複合体に供給されたことを示す。エンドソーム局在化に関する仮説はスペクトルへの酸性pHの影響を示す分光分析によって支持される。ポルフィリン蛍光スペクトルに対するpHの影響に関する知見はポッチエ [Pottier(1990), J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 6, 103~109] によって示された。外因性PPのいくらかは外膜に局在化する。光照射は赤色蛍光に影響し、外因性PPからの光生成物の形成を明示する。暗所での後インキュベーションはスペクトルの点特性を変化させ、その後は核膜に特異的な局在化が認められた。顕著な分光シフトはより低酸性の環境でのポルフィリン局在化と光生成物形成を反映するものと考えられることもできる。分光撮像は単一細胞における細胞下分光変化を可視化および測定することができ、この方法は従来の細胞集団の蛍光分光法とは顕著に異なっている。したがって、細胞質小器官の微細な分光シフトおよび光生成物の局在化を本発明の方法で明らかにすることができた。

実施例 4

サンゴにおける葉緑素のミクロ分布に対する表在生物の影響および蛍光分光撮像によるその検出

造礁性（リーフビルディング）サンゴはその組織に鞭毛藻と呼ばれる内部共生藻を滞在させている。鞭毛藻はその光合成物を宿主サンゴに寄与し [Muscatine et al(1989), Proc. R. Soc. Lond. B 236: 311~324; Lewis and Smith (1971) Proc. R. Soc. Lond. B 178: 111~129]、後者の排泄物を溶解無機栄養素として吸収することができる。ムスカチンおよびデリア [Muscatine and D'Elia(1978), Limnol. Oceanogr. 23: 725~734] は造礁性サンゴにおけるアンモニウムの吸収および保持が光によって増進し、これは鞭毛藻による同化を示唆することを示した。アンモニウム濃度の変化は鞭毛藻の集団密度に影響を与える [Muscatine et al(1989), Proc. R. Soc. Lond. B 236: 311~324]。バイテル [Bythell(1988), Proc. 6th Int. Coral Reef Sym. Australia, 2: 535~540] は鞭毛藻

によるアンモニウムの正味摂取があること、およびアミノ酸の異化によって分解されたあらゆるアンモニウムは共生的関係内で再利用されるに違いないことを明らかにした。彼は窒素の入手可能性が低いことによってこの関係の生産性が厳しく制限されたことを示唆した。

鞭毛藻はその刺胞動物宿主の活性によって生成される窒素およびリンに富んだ排泄物をいくらか獲得する [Johannes et al. (1970), *Limnol. Oceanogr.* 15: 579~586]。アンモニウムの内部循環は関係の窒素要求のいくらかを供給する。この窒素保存および回収方法は貧栄養水中での生存に不可欠である。しかしながら、回収は損失を防ぐのみに過ぎず、

成長および再生に必要な付加的な窒素を供給するものではないため、これらの要求を満たすためには外部供給源も必要となる。

鞭毛藻の集団密度は栄養供給によって制限される [Hoegh-Guldberg and Smith (1989), *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57: 173~186; および Cook and D'Elia (1987) *Symbiosis* 4: 199~212]。サンゴと密接に関係して生息する共生生物も異化窒素を関係に寄与することができ、それら近傍の鞭毛藻密度の増加等を招く。メイヤーおよびシュルツ [Meyer and Schultz (1985), *Limnol. Oceanogr.* 30: 157~166] はサンゴ頭部に滞在する魚がその排泄物で栄養レベルを増加させることによって組織のバイオマスおよび鞭毛藻濃度を増加させる可能性のあることを示唆した。

また、サンゴは様々な無脊椎動物を滞在させており、そのいくつかは定着性であってサンゴ骨格に付着しており、他は内部に潜伏するかサンゴ組織および骨格に覆い被さっている。サンゴに生育するカニであるクリプトチラス・コラリディテス (*Cryptochirus corallidytes*) は巨大なサンゴ骨格中のくぼみに見出され、イスラエル国エイラトのファヴィイダエ (faviidae) サンゴに一般的なものである。ポッツ [Potts (1915), *Papers from the department of Marine Biology*: 33~69] はこれらのカニの形態およびそれらのくぼみについて記載した。しかしながら、カニとその宿主との関係の本質は不明である。サンゴ共生体はそれらの排泄物を、鞭毛藻を含む近隣の藻に寄与することができるものと示唆される。

ピルガマチナエ (Pyrgamatinae) サブファミリーを構成するフジツボはサンゴの義務的共生体である。何人かの著者はサンゴとフジツボとの間で物質の交換があると主張しているが、そのような関係は未だ確認されていない。クック等 [Cook et al (1991) *Hydrobiologia* 216/217: 285~290] はフジツボ (*Savignium milleporum*) から排泄されたリンがそ

の宿主 (*Millepora dichotoma*) の鞭毛藻によって吸収されることを示した。

イガイ種 (*Lithophaga*) は生体サンゴの骨格内に潜伏する [Kleemann (1980), *Reef. J. moll. Stud.* 46: 13~54]。これらは生体サンゴ骨格を成長用待避所として用い、その上の海から濾過によって食物を摂取する。また、アストレオポラ・ミリオフタルマ (*Astreopora myriophthalma*) に生息するリトファーガ・シンプレックス (*Lithophaga simplex*) によって排泄されるアンモニウムが宿主サンゴの鞭毛藻によって吸収されることが示された。

したがって、共生的表在生物の排泄物が周囲領域を富栄養化するものと推測される。これは、葉緑素濃度の増加によって示される共生体近傍における高い鞭毛藻濃度を招くものであろう。このような微小な距離において藻の密度を測定することは困難であり、知られている限りにおいて、この距離内での変化は明らかになっていない。

本実施例は、この問題を実験的に解消することのできる本発明の方法の使用を記載するものである。すなわち、スペクトラキューブシステムを用いて、小領域での葉緑素濃度変化を検出した。

葉緑素分子が光で励起されると、自然蛍光として知られる過程によってフォトンが発せられる。分子から蛍光によって発せられた光はその励起光よりも赤く、波長の違いは振動エネルギーの損失を示す。生体内での葉緑素 a の蛍光発光スペクトルはその主帯域を 685 nm 付近に有する。多くの光合成顔料が溶液中で蛍光を示すことが知られているが、生体内では葉緑素 a の蛍光が支配的である。なぜなら、他の顔料はそれらの吸収したエネルギーを比較的高い効率で葉緑素 a に転送するからである。この蛍光の測定は葉緑素 a の検出および見積もりのための手段を提供する [Kirk (1983), *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosyst*

ems, Cambridge University, Cambridge, 401ページ]。365nmもしくは405nmで励起されると、刺胞動物組織はそれらの組織中の蛍光物質により、異なった波長で発光する。しかしながら、650nmを超える波長の蛍光源は鞭毛藻中の葉緑素である [Mazel(1985), Mar. Ecol. Prog. Ser. 120: 185~191]。ハーディ等 [Hardy et al(1992), Mar. Ecol. Prog. Ser. 88: 247~255] は、可視漂白に先だって葉緑素濃度の現象を明らかにするために葉緑素蛍光を測定した。

この目的で、エイラートのインターユニヴァーシティ・インスティテュートの前の紅海で試料を採取した。以下のサンゴおよびその関係物を蛍光分析に用いた。すなわち、ファヴィテス・ハリコラ (*Favites halicora*) と穴カニ (*Cryptochirus coralliodytes*)、ゴニアストレア・レチフォルミス (*Goniastrea retiformis*) とリソファーガ・レッセプシアナ (*Lithophaga lessepsiana*)、およびヒドロサンゴ (*Millepora dichotoma*) とフジツボ (*Savignium milleporum*) である。サンゴは実験室に運び、通気した海水中に保存した。すべての測定は採取2日以内に行った。鞭毛藻はウォーターピック (WaterPik) でサンゴから分離した [Jonnanes et al(1970), Limnol. Oceanogr. 15: 579~586]。

分離した鞭毛藻の蛍光分光撮像は、落射蛍光顕微鏡に取り付けたスペクトラキューブシステムで行った。分光類似性マップは、各蛍光マップから比較的高発光のピクセルを選択し、次いで蛍光マップ中の他のすべてのピクセルをこのピクセルと比較することによって作成した。選択されたピクセルに類似した発光度を有するピクセルは明るいドットを呈し、他のピクセルの類似の程度はドットの陰影で表現される。

生体サンゴの分光像は、サンゴを海水中に配し、接写レンズを取り付けたスペクトラキューブシステムで観察することによって得られた。サンゴは250Wのオリエル・キセノンランプ (Oriental Xenon

Lamp) で照明した。380nm~580nmの広帯域励起光 (ドイツ、ショット (Schott) 社の励起フィルタ BG-39) を用い、そのフィルタは光源とサンゴとの間に配置し、590nmの発光フィルタ (ドイツ、ショット社

のOG-59)をサンゴと分光撮像カメラとの間に配置した。

サンゴ上の各ピクセルで得た葉緑素蛍光値は特定部位の葉緑素濃度およびその様相に依存する。サンゴの表面の様相は励起および発光の強度に主要な影響を与える。この影響を除去するため、各ピクセルの励起値を系列の最高励起値に調節した(スペクトルの標準正規化)。トランセクトは共生動物を横切るように画像に沿って描出した。各ピクセルの励起および赤色発光の強度値を測定した。処理に沿っていずれかの赤色蛍光ピクセルを選択し、これを他のピクセルと比較することにより、コンピュータプログラムは、トランセクト(X軸)および蛍光強度(Y軸)に沿った波長(Z軸)の連続して正規化された3次元分光表示を作成した。この3D表示はトランセクトに沿った相対蛍光強度を、励起に対する地理的影響による補正と共に示した。

ピクセルは共生動物に隣接する画像上でランダムに選択し、4つの連続的なピクセルを追加した。各系列で、第1および第5のピクセル間の距離は2.4mmであった。各ピクセルの発光と励起との比は相対蛍光指標($RFI = \text{発光} / \text{励起}$)として定義した。5つの連続的ピクセル毎の正規値は、同一系列中の最高値のピクセルに関係づけることによって再び正規化し、各5ピクセル系列の相対値を得た。

鞭毛藻の蛍光スペクトルを測定するため、2つの分離した藻を用いた。図22に示すように、2つの鞭毛藻の蛍光マップ上の3つのランダムなピクセルの分光曲線は671nmで葉緑素蛍光ピークを示す。

共生体を担持する3つのサンゴを分析した。図23a, 23cおよび

23eは正規化前の3つの宿主の多ピクセル蛍光マップ、および分光分析に用いた処理を示す。トランセクトは共生体を横切った。図23b, 13dおよび23fは上記のように正規化された654nmおよび685nmの範囲における相対強度蛍光を示す。極大発光は670nmにあり、葉緑素aに典型的なものであった。ファヴィテス・ハリコラ(図23b)ではくぼみの周縁で最高蛍光値が認められ、トランセクトがくぼみから遠ざかるにつれて蛍光強度が低下しており、くぼみ周縁での高い葉緑素濃度を示している。しかしながら、くぼみ自体からは発

光がなかった。ゴニアストレア・レチフォルミスおよびミレアポラ・ディコトマ（それぞれ、図23dおよび23f）ではトランセクトに沿った明瞭な蛍光パターンはなかった。イガイのサイホン領域およびフジツボの開口部からは発光がなかった。

図24a～cは数種の放射状トランセクトに沿って等間隔で見出される9～11ピクセルの平均値の分析結果を示す。値は共生体に隣接するピクセルに対する相対値である。回帰曲線（点線）も示す。ファヴィテスおよびクリプトチルス（図24a）の場合にのみ、明確な蛍光勾配が検出できた。

図25a～cに示すように、3つのサンゴに対して分光類似性マップを構築した。上述のように、類似性マッピングのためのコンピュータ法は単一の選択された特異的スペクトルを元の画像を構成する残りのスペクトルと比較する。これは、参照アルゴリズムと他のすべてとの間の差を計算することにより、図25a～cに示すような分光類似性を有する新たな画像を作成する。最高RFI値を有する最高相対蛍光スペクトルを選択して分光類似性マッピングに使用した。図25aはカニのくぼみ周辺の高い葉緑素濃度を強調する。ゴニアストレア・レチフォルミス（図25b）ではイガイ（4mm）のサイホン近傍により高い傾向があるが、これは相対強度蛍光トランセクト（図23d）では明示されなかった。ミレアポラ・ディコトマ（図25c）では、共生体（3mm）近傍で局在化された葉緑素蛍光の類似したパターンがあり、これは主として、フジツボの皿を被覆するヒドロサンゴ組織上に存在するが、図25bに示すゴニアストレア・レチフォルミスではより不明瞭である。

したがって、本実施例では、本発明の方法を用いた、無脊椎動物共生体を担持する3つのサンゴ種における葉緑素蛍光分布が示された。これらの結果は共生カニ（*Cryptochirus*）のくぼみ近傍に高濃度の葉緑素aを示す。トランセクトに沿って顕著な葉緑素減少がある。この場合、葉緑素濃度の変化は鞭毛藻濃度の変化に起因しない。くぼみ周縁の高い葉緑素レベルは青緑藻に由来するものであり、これらの藻はくぼみ壁に存在する支配的な藻群である。ゴニアストレア・レチフォルミスおよびミレアポラ・ディコトマの場合、共生動物の葉緑素濃度の違いに

よる顕著な違いはない。しかしながら、分光類似性マップによって、ゴニアストレア・レチフォルミスおよびミレアポラ・ディコトマの場合にも鞭毛藻の変化を検出することが可能になった。類似性マップの利点は一度にマップ中の全ピクセルが比較可能なことにある。すべての共生体はその排泄物によって周囲の藻を富栄養化することができる。ファヴィテス・ハリコラの場合、栄養分補給に対して青緑藻は鞭毛藻と拮抗し、したがって、共生体の周囲の支配的な群であると考えられる。ゴニアストレア・レチフォルミスおよびミレアポラ・ディコトマの場合、鞭毛藻の濃度は共生体の影響を受ける。ゴニアストレア・レチフォルミスおよびミレアポラ・ディコトマにおける共生体の定量的影響の違いは共生体の寸法およびそれらの宿主サンゴの形状の違いによるものであろう。共生動物のそれらの宿主サンゴに対するこのような影響が報告されたのはこれが初めてである。

よって、本発明の分光撮像方法の使用はこのような変化の識別を可能にした。これらの方法は小さな表面領域からの蛍光を測定し、これをその領域における顔料濃度と関連づけることを可能にした。解像度は使用される光学系の倍率のみに制限される。分光撮像分析は 10^{-4} を超える他ピクセルスペクトルを生成し、これらのスペクトルを用いたアルゴリズム的比較および計算を可能にした。この実験的な系に対し、選択領域蛍光測定は、限定されたアレーの分光情報を明らかにできるに過ぎず、分光マッピングおよび再構築をすることはできない [Geze et al(1983), J. Photochem. Photobiol. B. 20: 23~35]。本発明の方法のもう1つの利点は、細胞中の顔料を測定する分光的方法の多くは破壊的であり、濃度測定は通常溶媒中での抽出後に行われるのに対し、本実施例に用いられた方法は生体内での顔料測定を可能にしたことにある。サンゴでは通常、ウォーターピックを用いて組織を除去し [Johannes and Wiebe(1970), Limnol. Oceanogr. 15: 822~824]、抽出後、分析を行う。ウォーターピックを用いて組織を除去することにより、小さなサンゴ表面領域の検査ができなくなり、サンプルの空間的境界は不明瞭になるが、本発明の方法を用いれば、サンゴは無傷のままであり、測定後は水に戻すことができた。

スペクトラキューブおよび一次結合アルゴリズムを用いた、改良された蛍光インシチュハイブリダイゼーション (FISH)

本発明の方法と組み合わされたスペクトラキューブシステムを用いた分光生物撮像は、1回の測定で高感度に、多数のプロープの同時検出を可能にすることによって、FISHの有用性を高める。この結果、FISH

による遺伝子異常の検出における効率および信頼性が大幅に向上する。

上述のように、蛍光インシチュハイブリダイゼーション (FISH) は多くの研究および診断分野において重要性の増大する役割を果たしている。70年代におけるその導入開始以来、FISH技術は顕著に進化し、単一遺伝子配列、部分的染色体配列および全染色体 (すなわち染色体ペインティング) さえの検出および同定を可能にした。FISHの多くの用途は、病気の早期検出から、遺伝子病および異常を発見してその後に治療する出生前診断、体細胞異数性診断等にまで及んでいる。

相同の核酸配列のハイブリダイゼーションに基づくFISHの高い感度および選択性により、たとえ1キロベース (kb) という短い配列であっても観察可能である (そして、これはおそらく時と共に改善され、15~30ベースペアという短い配列の検出まで可能にし、この結果、点突然変異の検出をも可能にするであろう)。FISHはDNAプロープ、蛍光染料、蛍光顕微鏡法、高性能CCDカメラおよび撮像技術の改良と共に改良されている。

多数のプロープを同時に検出する能力はすでに文献でFISHを効率的な診断器具とするものとして示されている [Rudkin and Stollar(1977), Nature, 265, 172~173]。しかしながら、従来の方法は面倒であり、使用が困難である。以下に例示するように、適当なアルゴリズムと組み合わせたスペクトラキューブシステムによれば、その分光解像度および感度によって、多数のプロープの検出が大幅に改善される。この能力を例示するため、図26a~cを参照する。これらは、蛍光体テキサスレッドおよびローダミンで標識された染色体1および染色体17に特異的なDNAプロープを用いて行った間期FISH測定の1例を含むものであり、その蛍光スペクトルは極めて類似している。染色体1プロー

ブは染色体のサブテロマー領域のためのミッドサテライト・プローブであり、テキサスレッドで標識されてビオチン後ハイブリダイゼーションを介してDNAプローブにリンクしていた。染色体17プローブは染色体の動原体領域のための α サテライトプローブであり、ローダミンで標識されてディゴキシゲニン後ハイブリダイゼーションを介して第2のDNAプローブにリンクしていた。図26aは元画像を顕微鏡を通して眼に見える状態で示し、図26bはスペクトラキューブシステムで測定および処理した後の同一のサンプルを示し、図26cはテキサスレッド(T)およびローダミン(R)蛍光体の蛍光スペクトルを示す。

図26cに示すように、テキサスレッドおよびローダミンの分光ピークは15nmしか相違せず、したがって、フィルタに基づく系を用いてこれらを区別することは極めて困難であろう。

図26aに示す顕微鏡を通したカラーFISH画像を観察すると、正確な数のドット(1~4で示す)の認識および画像に現れるプローブ型の信頼度は特に高くない。一方、図26bに示すように、スペクトラキューブシステムは各スペクトルに対して測定されたスペクトルを利用するものであり、ドットの存在を確かめ、これらを正確に計数し、異なる対をそれらの間の小さな蛍光差によって高信頼度で識別することができる。テキサスレッドおよびローダミン蛍光の人工着色によって、図26cに示すように、プローブに特異的な蛍光の位置を高精度に決定することができた。すなわち、ドット1および2はテキサスレッドのものであり、ドット3および4はローダミンのものである。

図27a~bは6つのプローブを用いた、間期における核DNAのハイブリダイゼーション後のFISH測定の1例である。図27aは元画像を示し、図27bはすべての検出された対のスペクトラキューブ測定、分光処理および人工着色ディスプレイを示し、図27cは、スペクトラ

キューブシステムを用いる3重ジクロイックフィルタを通して検出された、ハイブリダイゼーション後の6つの染色体のスペクトル(染色体によって1, 8, 10, 11, 17およびXとラベルされている)を示す。(蛍光体、プローブおよび染色体の詳細については、後述の表2およびChroma Corp. Cat No.61502の記

載を参照されたい。)

図27 aは間期の細胞核の元RGB画像を示すものであり、これから、肉眼でも、あるいは単純なRGBカラー測定を用いても、色を互いから識別することは困難であることが明らかである。熟練した観察者でも最良の場合に6色のうち、3色を検出できるに過ぎない。しかしながら、図27 bは、バックグラウンド・サブトラクションおよび分類(上記を参照)のための独自の分類アルゴリズムで分光データを処理した後の、図27 aに示したものと同一のサンプルを示し、この結果得られるドットは以下のように人工着色で強調された。すなわち、茶-B1;シアン-C;青-B2;黄-Y;緑-G;および赤-Rであり、背景には人工着色である黒-B3を付与した。観察されるように、6対の蛍光体すべてが見え、対同士を容易に識別することができる。

さらに、青(B2)で強調された1対は肉眼もしくはカラーカメラの使用では殆ど見つけれないが、分光立方体上でバックグラウンド・サブトラクション・アルゴリズムを適用した後には検出された(図27 aと27 bとを比較されたい)。

使用されたプローブは染色体8, 10, 11, 17およびxの動原体領域用の5つの α サテライトプローブ、および染色体1のサブテロマー領域用のミッドサテライトプローブである。上記染色体の各々およびDAPIカウンタ染色(b a c k g.)を標識するために使用した蛍光体、それらの発光ピークおよび人工的なディスプレイ色の分類を表2にまとめる。

表 2

染色体	蛍光体	蛍光ピーク	ディスプレイ色
8	SpectrumOrange TM 1	588 nm	茶 (B 1)
1 0	SpectrumGreen TM 1	538 nm	シアン
(C)			
x	Aqua 1	480 nm	青 (B 2)
1	Texas-Red 2	615 nm	黄 (Y)
1 7	FITC 3	525 nm	緑 (G)
1 1	Texas-Red 2 + FITC 3	615, 525 nm	赤 (R 1)
backg.	DAPI 4		黒 (B 3)

- 1 Vysis, Downers Grove, IL, U. S. から標識デオキシヌクレオチドとして得られるもの。
- 2 プローブを含有する予めハイブリダイズしたジゴキシゲニンと抗ジゴキシゲニン抗体を介して結合したもの
- 3 プローブを含有する予めハイブリダイズしたジゴキシゲニンと抗ジゴキシゲニン抗体を介して結合したフルオレセイン-5-イソチオシアネート
- 4 カウンタ染色に用いられる4', 6-ジアミジノ-2-フェニリン
ドール

図27cに示した6つの蛍光体の各々の正規化された分光シグネチャ

から、数個の比較的広い分光範囲で測定を行うフィルタに基づいたシステムでは、スペクトル同士が大きく重なり合っているため、異なるプローブ種を確実に識別することは不可能であることが明らかである。このようなシステムは、各プローブの強度の絶対的測定により依存し、したがって、バックグラウンド信号およ

びノイズにより影響される。さらに、細胞自体に由来する自然蛍光でも分光の重なりが生じることに留意されたい。この場合にも、各ピクセルについて分光情報が得られることによって、自然蛍光の寄与が除去でき、より正確な結果が得られる。

画像の各点の全スペクトルを測定することによって、プローブの特異性の問題も克服することができる。実際にいくつかの場合、ある染色体DNA配列に適合するプローブが別の（通常は類似した）配列に対してもより低い特異性を有し、この第2の配列にもより低い確率でハイブリッド化する。この結果、ある種のプローブが異常に多くなる、誤った外観を呈することになる。しかしながら、プローブの化学的環境の小さな変化により、第2の場合の蛍光スペクトルは第1のものからわずかにシフトしている。スペクトラキューブシステムは、その分光解像度および感度により、この影響を解消することができる。同様な影響は、サンプル調製中に十分に洗浄されなかったプローブについても存在し、誤った陰性の診断に寄与する。したがって、本発明の方法と組み合わせられたスペクトラキューブシステムは、誤った診断の起こる危険性を低減することを助けるものである。

多数のもしくは類似した染料に一般化して、図26a～bおよび27a～cの例は、多数のプローブを検出および識別することが可能であること、および、それらの間に小さな分光差が存在していれば、スペクトラキューブが1回の測定でそれらを検出かつ同定することを示している。

当業者には、他のおよび／もしくは既知のおよび未発見または未開発

の蛍光体および蛍光体の組み合わせを上述の様々なFISH用途に使用して多数の部位を同時に検出したり、各染色体の各型を特有の色で染色したりできること等が明らかである。従来の細胞および分子生物学で使用される蛍光体のリストは、Kasten(1993), Introduction to Fluorescent Probes: Properties History and Applications, in Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Research, Mason編、Academic Press社、London、24～31ページに見出される。また、例えば、生物発光および化学発光のような他の標識法ならびに非蛍光標識法も同様に適用できることが当業者には明らかである。

したがって、FISH分析にスペクトラキューブシステムを使用することによって、以下のような主要な利点を得ることができる。スペクトラキューブシステムはその高分光解像度によって多数のプロープの同時検出を可能にするのに対し、従来の手段を用いて（例えば蛍光顕微鏡を用いて）FISHを行うと、1回のハイブリダイゼーションに使用されるプロープ数が2～4に制限される。したがって、FISH分析にスペクトラキューブシステムを使用することによって、労力および時間が節約される。さらに、FISH分析にスペクトラキューブシステムを使用すると全分析に少数の細胞しか必要でなくなるが、これは分析すべき細胞の数が限られている場合には重要な特徴である。

実施例6

スペクトラキューブシステムを使用した網膜異常診断

糖尿病性網膜症は潜在的視覚破壊状態であり、多くの場合、時期を得たレーザー治療で制御することができる [Ferris(1993), (解説) JAMA 269: 1290～1291]。米国眼科学会は患者が治療されるべき臨床的状态を

何時進行させたかを検出するクリーニングスケジュールを示唆した [Diabetic Retinopathy: American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns, San Francisco, Cal.: American Academy of Ophthalmology Quality of Care Committee Retinal Panel, American Academy of Ophthalmology, 1989]。

しかしながら、示唆されたクリーニングスケジュールは高価であり、また、ある個人にとっては、患者は時折スケジュールされた検査の間に深刻な網膜症を進行させることもあるため、現在の高価なクリーニングでも充分ではない。それに関わらず、クリーニングは費用効率が高いことが示されている [Javitt et al(1989), Ophthalmology 96: 255～64]。この研究は、危険性の高い患者と低い患者をより効果的に同定できれば、健康管理追跡検査にかかる大量な金額が節約できることを示している。したがって、糖尿病性網膜症のクリーニングの精度を向上し、それにかかる費用を低減することのできるあらゆる方法は臨床的価値の高いものとなる。

現在、糖尿病性網膜症のためのクリーニング評価として推奨されているもの

には、詳細な網膜評価および、選択された場合におけるカラー網膜写真法が含まれる [Diabetic Retinopathy: American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns, San Francisco, Cal.:American Academy of Ophthalmology Quality of Care Committee Retinal Panel, American Academy of Ophthalmology, 1989]。網膜のフルオレシニン血管撮影法は現在日常的に行われているが、侵略的で、不快なものであり、時には死を招く。さらに、フルオレシニン血管撮影法で得られる付加的な情報は患者を即座のレーザ治療の恩恵を受け得るものとそうでないものとに分類する助けとならない [Ferris(1993), (解説) JAMA 269: 1290~1]。

本発明によれば、スペクトラキューブ技術を特別に開発されたアルゴリズムと組み合わせ、分光データと撮像情報を同時に使用することにより、網膜虚血の異なった段階を分類することができ、したがって、医者が多くの糖尿病患者を虚血性のものと非虚血性のものとに分類することを可能にする臨床手段となる。

網膜への酸素供給は脈絡膜および網膜循環の双方によって提供される。脈絡膜は無血管の外網膜中の光受容体への酸素源であり、網膜循環は内網膜中の中性要素および神経繊維への酸素供給を維持する上で重要な役割を果たす。網膜の高い酸素要求により、糖尿病性網膜症、高血圧、鎌状赤血球症、および血管閉塞性疾患において観察されるような循環変化は機能障害および広範な網膜組織損傷を招く。

ヒックハム等 [Hickham et al(1963), Circulation 27, 375] により、網膜管中の酸素飽和の非侵略的な測定が初めて提案されたが、これは光学ディスクを横切る網膜管に対して2波長写真法(560および640nm)を使用するものである。より進んだ方法はDelrori(1988), Applied Optics 27,1113~1125に提案されたピットマン(Pittman)およびデュリング(Duling)の3波長法に基づくものである。

スペクトラキューブシステムは、自らが供給する分光情報に基づき、網膜管におけるヘモグロビンの飽和レベルの非侵略的測定を可能にするだけでなく、自らが提供する撮像情報のため、網膜虚血の検出およびマッピングに用いることがで

きる。ニューラルネットワークアルゴリズムの主要成分と組み合わせれば、異なった網膜症段階の分類や糖尿病患者の治療分類にも使用することができる。

生体組織における多くの化学物質は管および代謝の機能に関係する。したがって、たとえ網膜虚血の主要素が、オキシ-およびデオキシ-形状のヘモグロビン濃度を通して測定可能な酸素であったとしても、また、

NAD^+ 、 NADH 、フラビン、チトクロム等、他の構成成分の濃度を測定することによっても重要な情報を得ることができる。必要かつ特定の測定で利用可能な時間およびコンピュータ資源の量と得ることのできる情報量、感度、信頼性および特異性とは相殺関係にある。

従来技術の多くが、このような組織の化学成分の分光検出を、反射における吸収ピーク、およびUVもしくは青色光における蛍光ピークを単波長もしくは多波長励起でそれらの濃度に相関させるものとして記載していることを考えれば、本発明の方法と組み合わせたスペクトラキューブシステムはこのような成分の1つ以上の濃度を同時にマップするために使用することができる。スペクトラキューブシステムが作動させる特定のハードウェアによって、得られる情報の型および量が決定されるであろう。

例えば、最も単純かつ最も直接的な構成は、スペクトラキューブを基底部カメラのCCDポートに取り付けて網膜が撮像されるようにすると同時に、基底部カメラの同じ広帯域白色光源を用いて網膜からの反射光を測定するものである。この場合、酸素濃度はデロリ (Delori) のアルゴリズムを用いて測定することができ [Delori(1995), Appl. Optics Vol. 27, 1113, 1988, およびAppl. Optics, Vol. 28, 1061; およびDelori et al(1980), Vision Research, Vol. 20, 1099]、また、同様に、撮像された画像の全ピクセルに拡張することができる。スペクトラキューブに基づいたより複雑なシステムは(1)自然蛍光分光撮像、(2)UVもしくは青色光蛍光励起ランプを用いる分光撮像、(3)単一で、連続して、もしくは順に、波長650, 442, 378, 337, 325, 400, 448, 308, 378, 370, 355, および他の同様な情報を与える同等な波長のいずれかにあるレーザ励起蛍光を用いる分光撮像である。

これらの構成はいくつかの様式で構築することが可能であり、独立していてもよく、また、同一の装置中でいかなる数の組み合わせに結合してもよい。装置は光源（複数でもよい）、基底部カメラおよびスペクトラキューブからなり、データを解析し、眼科医に有用なように表示するためのコンピュータおよびソフトウェアを含む。

白色光反射、自然蛍光、単波長連続波レーザー励起蛍光、もしくは多波長レーザー励起蛍光の場合、サンプルは照明され、分光像が測定される。

パルスレーザー（複数でもよい）照明の場合、スペクトラキューブの実施方法は若干変形され、いくつかの基本的でも実質的でもないが装置の作動に重要なハードウェア変更を必要とする。これらは以下の通りである。

単一パルスレーザー励起蛍光分光撮像の場合、レーザーパルスとスペクトラキューブのCCDのフレーム取り込みとを干渉計の走査角度と同期させ、各パルスにおいて干渉計がステップを行い、新たなフレームがコンピュータによって収集されるようにする（一般に数パルスを各フレームのために使用することもできるが、この数はフレーム毎に変化しないようにする）。こうして、各OPD値において、インターフェログラムは所定の（異なった）数のレーザーパルスに対応する。これは、各フレームを同一の総照明強度で取り込むことを確実にするために必要であり、さもなければ、各フレームは異なった数のレーザーパルスに由来する蛍光を測定することになり、インターフェログラムは歪む。

数パルスのレーザーに誘発された蛍光分光撮像の場合、実施方法は2つの手法で行うことができる。すなわち（1）上述のように順に各レーザーについて全分光立方体を収集すること；これは、測定中に1つのレーザーのみが活性化され、最後には各レーザー波長について1つの測定された分光立方体が存在するようにすることを意味する、と（2）各レーザーを順

に干渉計およびフレーム取り込みと同期させてパルス化し、すべてのレーザーが順に次の干渉計ステップおよび次のフレームの取り込みの前に切り替えられるようにし、最後には1つの分光立方体のみが測定されるようにすることである。

最後には当然、すべての情報を分析および解析しなければならない。最も重要

なアルゴリズムは、画像の異なった波長間および異なったピクセル間で得られる強度を比較するものとなろう。これらのアルゴリズムは強度の変形、および組織中の異なった領域間および異なった波長間の比を考慮すべきである。この方法は極めて感度が高く、また、大きな定量的情報を提供するものであるため、スリットランプ撮像（白色光もしくは濾過光）の代わりとなり得る。

他の用途は当業者に明らかであろう。これらには脈絡膜虚血、急性区分脈絡膜虚血、虚血性視神経症、角膜および虹彩障害等による視覚喪失、および現在白色光や由来の異なる蛍光を用いた撮像法で分析されている多くの他のものが含まれる。

実施例7

腸、膀胱、肺、頸部および他の器官における生体内での癌性組織のマッピング

スペクトラキューブシステムは内視鏡および腹腔鏡を含むあらゆる撮像光学要素に取り付け可能であるため、手術前、中、もしくは後において外科医が切断の開始部位、停止部位を決定したり、病理組織が手術において除去されたかどうかを判断する助けになり得る。スペクトラキューブシステムは本質的に組織の性質を、その分光特性に関係した化学組成を通して分析し、使用者が把握、判断および行動を行うための視覚

マップ（通常強調されたもの）を提供するのに本質的に適している。

生体内で癌性組織を検出する場合、ハードウェア構成および関与する分析および表示アルゴリズムの双方は上述の眼科の実施例（実施例6参照）に酷似している。違いは集光光学要素（基底部カメラに代わる異なる型の内視鏡）、検出に関わるいくつかの基本的分子成分の型であり、これらのいくつかは、酸素濃度のようにおそらく共通であり、他の付加的なものはコラーゲンおよびエラスチン、DNAクロマチンのような細胞核内の遺伝子物質等である。多波長もしくはパルス化励起の場合における照明および同期の要求も同様である [Pitris et al., Paper presented at European Biomedical Optics Week by SPIE, 1995年9月12～16日、Barcelona Spain]。

実施例8

主要コンポーネント解析を用いた細胞および組織分類による診断病理学の補助

今日、細胞および組織の顕微鏡検査に基づいて診断および手術の決定が多くなされている。検査員は、血液、膺および頸管スミアおよび尿サンプルのような細胞スミア、もしくは着色および／もしくは固着された組織に基づいて決定を行う。典型例として広く知られたP a pスミアがあり、これはパピロマ(Papilloma)ウイルス頸管癌を検査するため、多数の頸管スミアについてなされる。

解析は病理学者により行われるが、病理学者は長年にわたって顕微鏡を通して観察し、細胞の形状、色彩、核および細胞質の相対サイズ、群生する細胞およびその他の空間的な特徴などに基づいて、細胞の認識および分類を実際に学んでいる。病理学者はまた、スミアに見られる残滓

物質および人工物を無視することを学んでいる。

このような検査はしかしながらたぶん主観によるところが多く、毎日行われるべき検査があまりに多いため、しばしば技術者が予備選別を行って、深い検査を必要とする疑いのある細胞もしくは組織のみを病理学者に提示している。但し、予備選別は人間のミスもしくは疲労などによりある程度信頼性に欠ける可能性がある。

病理学分野においては、このようなテストの客観性および信頼性をもっと向上させるとともに自動化すべきであるという必要性が広く認識されている。今日、病理学者は最終診断を行う必要があるが、将来において選別および診断が自動的に行えるようになるとは確信できるものではない。

賢い変換および表示アルゴリズムを有した SpectraCube™ テクノロジーは、病理診断の全ステージにおいて、選別において用いることができ、病理学者による診断における客観性及び信頼性の向上の助けとなり、いずれは完全な自動診断の助けとなりえる。

病気に犯された細胞は、病気の種類および段階に応じて化学的に大きく変化することが良く知られている。その結果、これらの変化は、分光分析データ、着色細胞もしくは組織の光透過、自己蛍光、追跡プローブの蛍光もしくは顕微鏡観察における反射コントラストとして現れる。分光分析と撮像と組み合わせられてなる

SpectraCube™ システムは、これら全てのモード観察に用いることができ、これらの特性を検出するとともに定量測定を行うための非常に優れた装置であり、適切な数学的な処理を行うことにより、病理学者もしくは外科医に診断決定のための測定結果を提示することができる。

表示および変換のために用いられるアルゴリズムは上述のいずれのもの、例えば、異なるタイプについての類似マッピングおよび分類法、主

要コンポーネント解析法、神経ネットワーク法、その他の当業者にとって明らかな方法である。

図28～図30には、診断病理学の分野での本発明を用いる方法を示している。図28は、パパニコラテスト（すなわち、P a p スミア）用に通常的に用いられる頸管スミアHaematoxy-Eosin着色細胞について、本発明の方法を用いて得られた透過顕微鏡RGBイメージを示す。イメージ（画像）の中央の細胞（Aマーク部であり、細胞の核を示す）がHPV(human Papilloma virus)細胞（すなわち、癌性の頸管細胞）であり、一方、イメージの右下部細胞（Bマーク部であり、細胞の細胞質を示す）が正常頸管細胞である。符号C、DおよびEは多形核細胞（すなわち、好中球）を示し、鱗状細胞の核をB符号で示し、癌性細胞の細胞質をそれぞれ示す。これら細胞は白黒イメージで示されている（但し、オリジナルはカラーである）ため、若干不鮮明であるが、これらの境界は手作業で付けられた人工的な線で区別されている。

得られたスペクトルキューブは上述の主要コンポーネント解析が行われる。この目的のため、全スペクトルレンジ（450nm-800nm）が20の狭い波長レンジに分割される。すなわち、 $N=20$ であり、ここでは、各波長レンジのそれぞれにおける各ピクセルの光強度に基づく20の白黒イメージとして参照する。言い換えれば、20の所定主要コンポーネントが存在する。これら20のイメージは、上述の行列（マトリクス） B' の列を形成するために用いられる。行列BおよびC、さらに行列Cの固有ベクトル V_j および固有値 μ_i が上述のようにして計算される。図29において、固有値 μ_i が、20の異なる主要コンポーネント、すなわち、波長レンジ（ $i=1, \dots, 20$ ）の関数としてプロットされる。

図 30 a は、ピクセル強度としてベクトル積 $B V_{20}$ の値を用いて得られた白黒強度イメージを示し、これは白黒カメラを通して観察されるオリ

ジナルイメージや、図 28 のように白黒イメージとして表示されたイメージと非常に良く似ている。しかしながら、図から分かるように、サンプルに固有の重要なスペクトル情報を有しておらず、サンプルを通過した光に影響され、顕微鏡ランプのスペクトルを主として有する。一方、図 30 b, 30 c に示されるように、多くの固有ベクトル、例えば、 $B V_{10}$ および $B V_{13}$ を用いて同様に得られた強度イメージは新たな効果を示す。癌性細胞（図 28 の A）の端部のまわりのピクセルおよび癌性細胞のみが他の部分より高い強度（図 30 b, 30 c における白色ゾーン）を示し、一方、正常細胞（図 28 の B）は他のイメージ部分より低い強度（図 30 b, 30 c における暗色ゾーン）を示す。このため、図 29 に示されるように検査イメージにおいて存在値が非常に低い主要コンポーネント 10 および 13 に応答する物質もしくは構造は、それがなんであれ、癌性細胞に特有であり、正常細胞の下で表されるということを結論付けることができる。このため、あるタイプの細胞もしくは細胞の一部のみが行列 B および固有値 V_i とともに構成される一つもしくは複数のイメージを示すという事実を、本発明の方法により測定されるときに各タイプを分類するために用いることができる。

まとめると、先の米国特許出願第 08/392, 019 号に、二次元 CCD センサおよび電子機器を組み合わせ得られる特に高感度の干渉法に基づくユニークな分光撮像システムが述べられており、これによれば、空間的に系統だった方法で何百何千ものスペクトルを同時に特定しコンピュータに記憶することができる。本発明は、これら機器（ハードウェア）が生物研究、医学治療および診断にどのように用いることができるかということを述べる。ここに提案される方法における分光分析と撮像との組み合わせ方法は新たな分野を開くものであり、これを分光生

物撮像と称する。

本発明が優れている点は、分光測定および測定データをサンプルの全ての点（

すなわち、ピクセル)において独立して且つ同時に収集できるので、サンプル位置を関数として物質および分子タイプおよびその集中度に関する情報を提供でき(これにより物質の存在および集中度をマップ化できる)、さらに、これと同時に従来の撮像法も同時に得ることができることである(これにより従来の形態学的解析(例えば、米国特許第4,965,725号参照)も可能となる)。このため、本発明は、光透過、反射、散乱および蛍光方法を用いて高い空間およびスペクトル解像度で、細胞および組織成分、構造、器官、遺伝物質、投与蛍光追跡プローブの存在検出および定量検査や、細胞および組織内での投与薬剤の分配測定を行うことができる。

本発明のさらなる効果は、分光分析データの変換が非常に単純であることである。本発明に係るデータは位置毎に集められるのではなく、撮像画面から集められ、いくつかの波長ではなく多数の波長に対して集められるという事実から、本発明は、(1)例えば、同一の患者の癌性および非癌性組織表面を比較するので、各患者の組織を比較する場合とは異なり、着色効果を自動的に除去することができ、(2)異なる波長での強度の比較を行うことができるので、求める特性からは独立したスペクトル効果を自動的に除去することができ、(3)一旦、システムソフトウェアが適切な特性強調(例えば、人工色もしくは他の手段の使用)を行ったり、適切なディスプレイ(例えば、コンピュータの画面もしくはビデオ画面)上に強調イメージを表示したりすると、イメージにおける求める特性およびその境界を容易に視覚化してユーザに示すことができる。

本発明のさらなる効果は、フィルター、格子およびその他の分散技術

による周知の Fellgett もしくは多重効果フーリエ変換分光分析であり、これはスペクトル測定において高い S/N 比を示す。但し、ノイズレベルが信号から独立している(背景もしくはシステム限定作動)時、およびノイズが信号の平方根に比例し(フォトンノイズ制限)且つ信号が全スペクトルレンジでの平均信号より高い場合である。

本発明のさらなる効果は、先の米国特許出願第08/392,019号に詳細が開示されている空間的な光学形状により、このシステムコンセプトおよびシス

テムハードウェアそのものを撮像すべきどのようなサンプル表面にも用いることができ、現存するもしくは将来開発されるどのような撮像光学系にも用いることができるということである。

本発明の重要点はまた、計測データを意味ある方法で変換し表示するためにコンピュータソフトウェアとして用いられる数多くの数学的アルゴリズムである。同一の機器（主として研究分野のユーザ用であり、様々な作業が可能となる）において、もしくは別々の機器（実務家用であり、特化された迅速な作業が可能となる）において、さらに、種々の用途に応じて要求される多様性の組み合わせおよびレベルにおいて、多くのタイプのアルゴリズムを用いることができるのは明らかである。このアルゴリズムは（現在および将来、この技術分野で知られている）スペクトル情報の変換に厳格に基づくものとするところかできる。このようなものとしては、特定の化学エレメントもしくは分子のスペクトル吸収もしくは発光ピークがあり、このような化学物質の集中度マッピング、もしくは厳格に形態学に用いられる。このとき、イメージ形状および現在および将来のイメージ処理アルゴリズム、もしくはスペクトルおよび撮像情報の組み合わせが用いられ、このようなものとしては、例えば、主要コンポーネント解析、算術演算、背景除去もしくは異なるタイプの分類分けによる全ピクセルのスペクトル間の比較、異なるピクセルもしくは

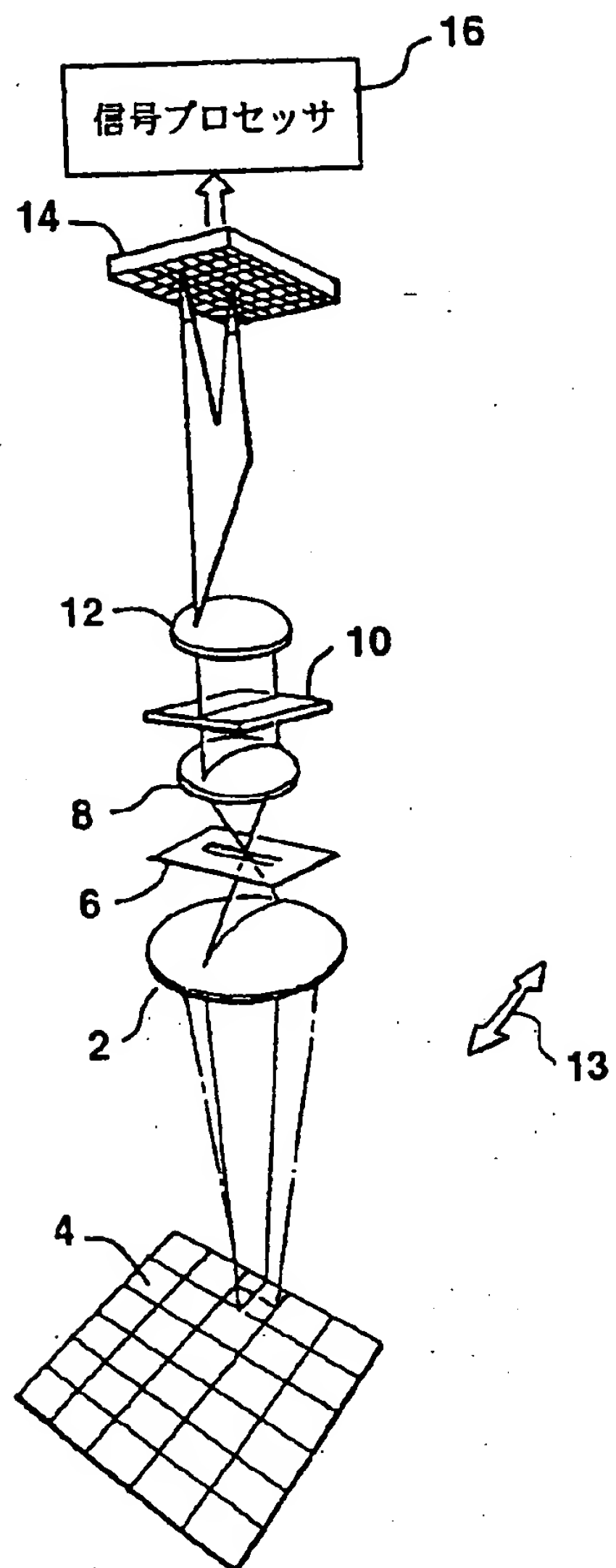
は空間範囲間での比較、および異なる波長もしくは空間範囲間での比較がある。

当業者によれば、上述の撮像システムもしくは撮像分光分析システムに付属のものを用いて、もしくは将来出現する撮像装置を用いて、上記のものと類似もしくは関連する多種の用途を見いだすことができるのは明らかである。

以上においては、限られた数の実施例に基づいて本発明を説明したが、これ以外にもたくさん本発明の変形例、修正例、および用途があることは明らかである。

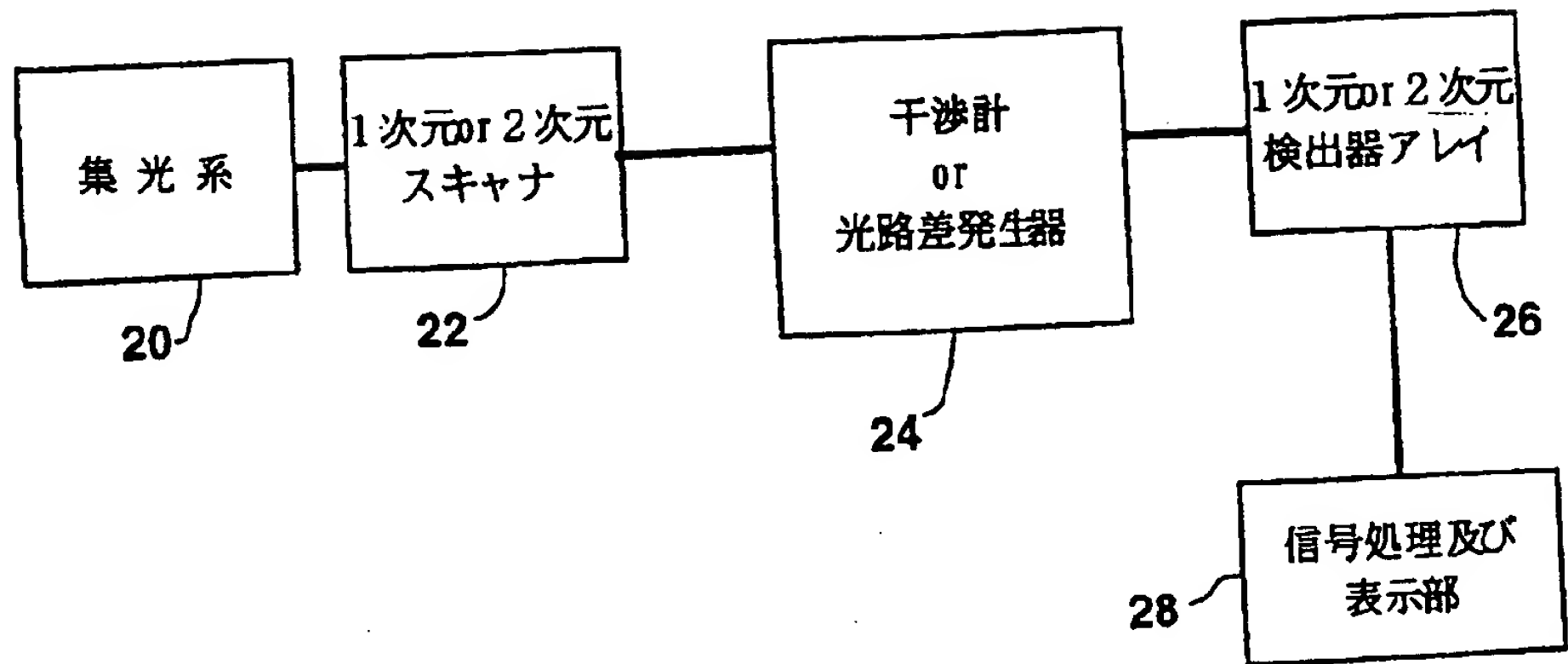
【図1】

図 1



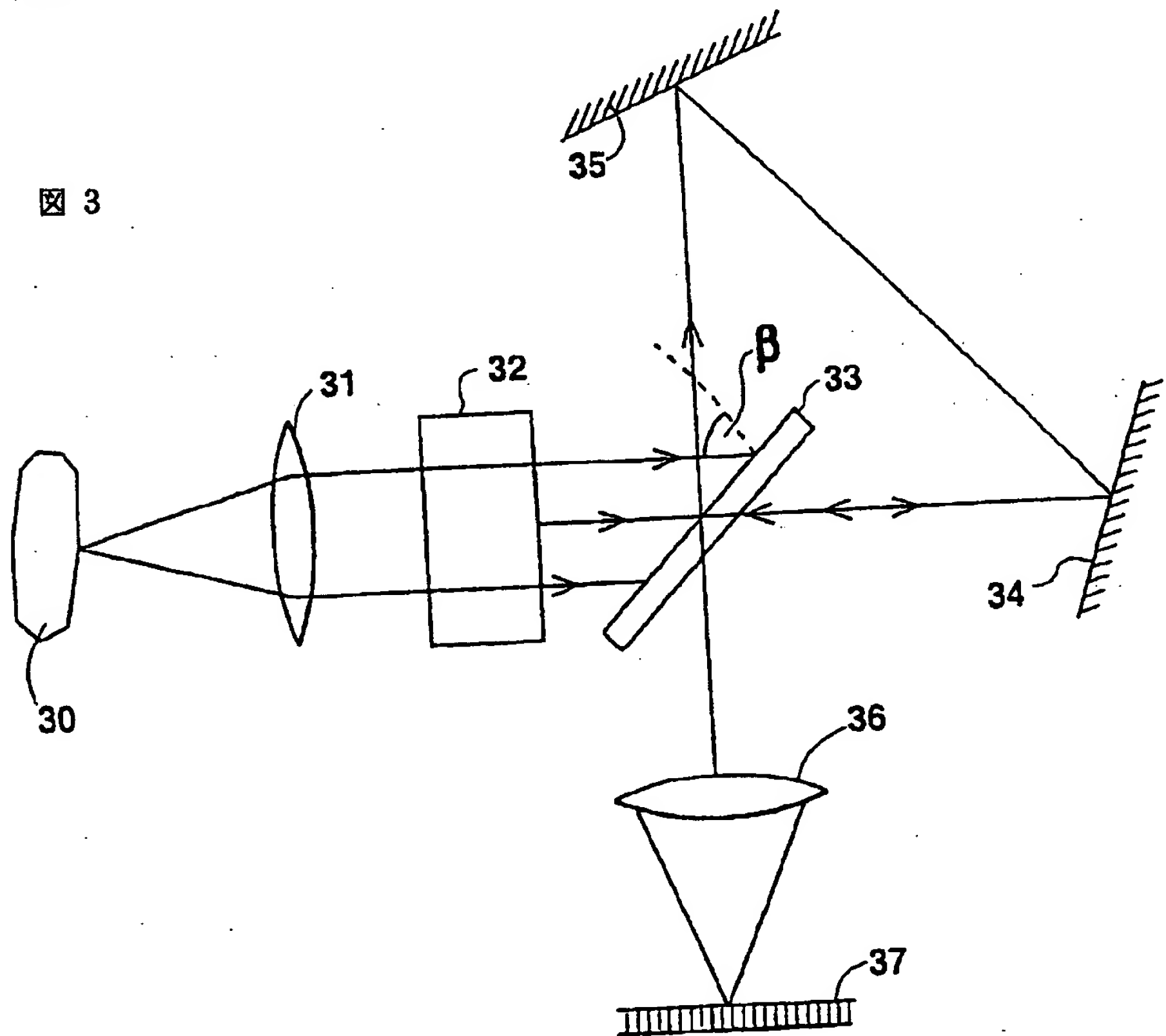
【図2】

図 2



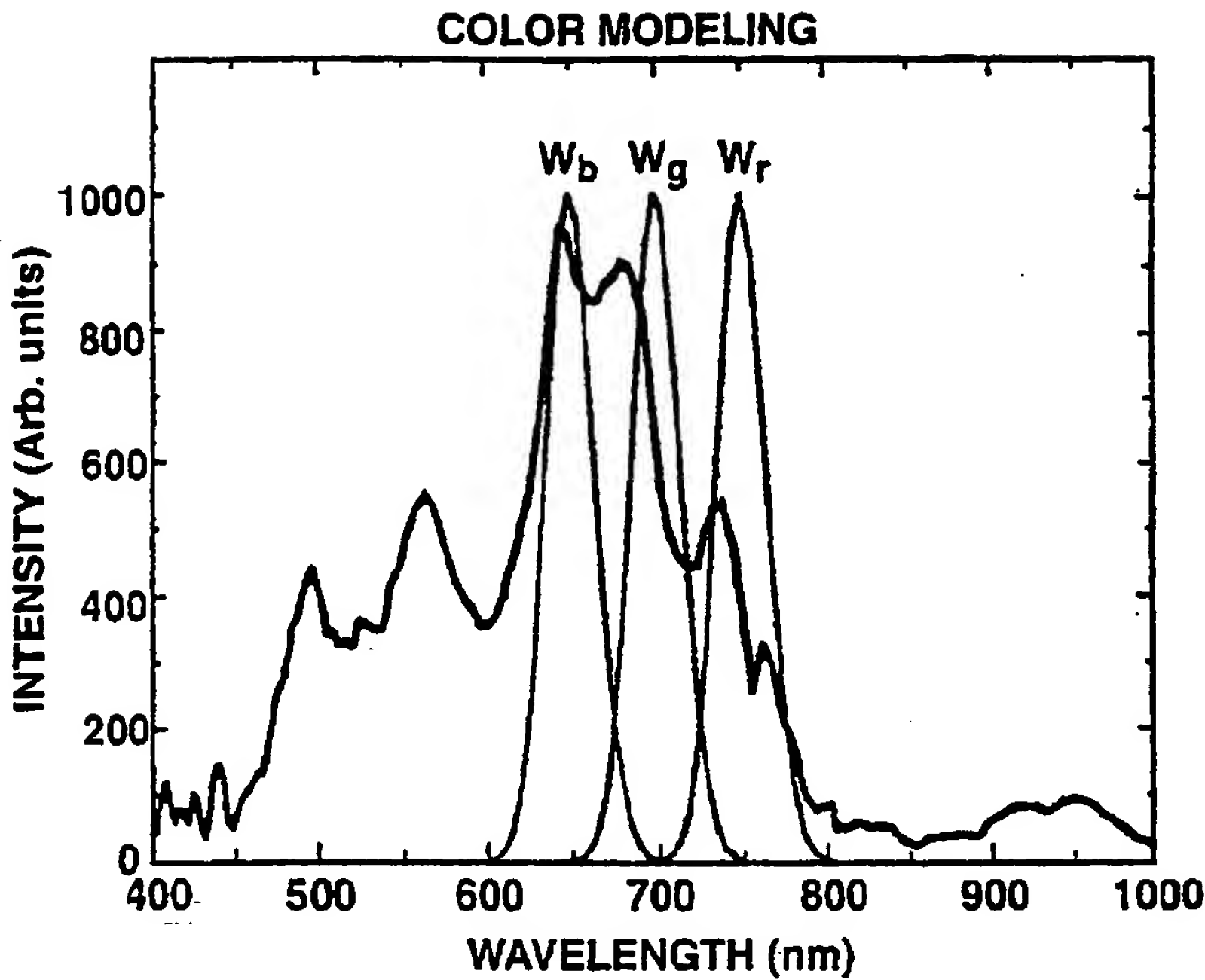
【図3】

図 3



【図4】

図 4

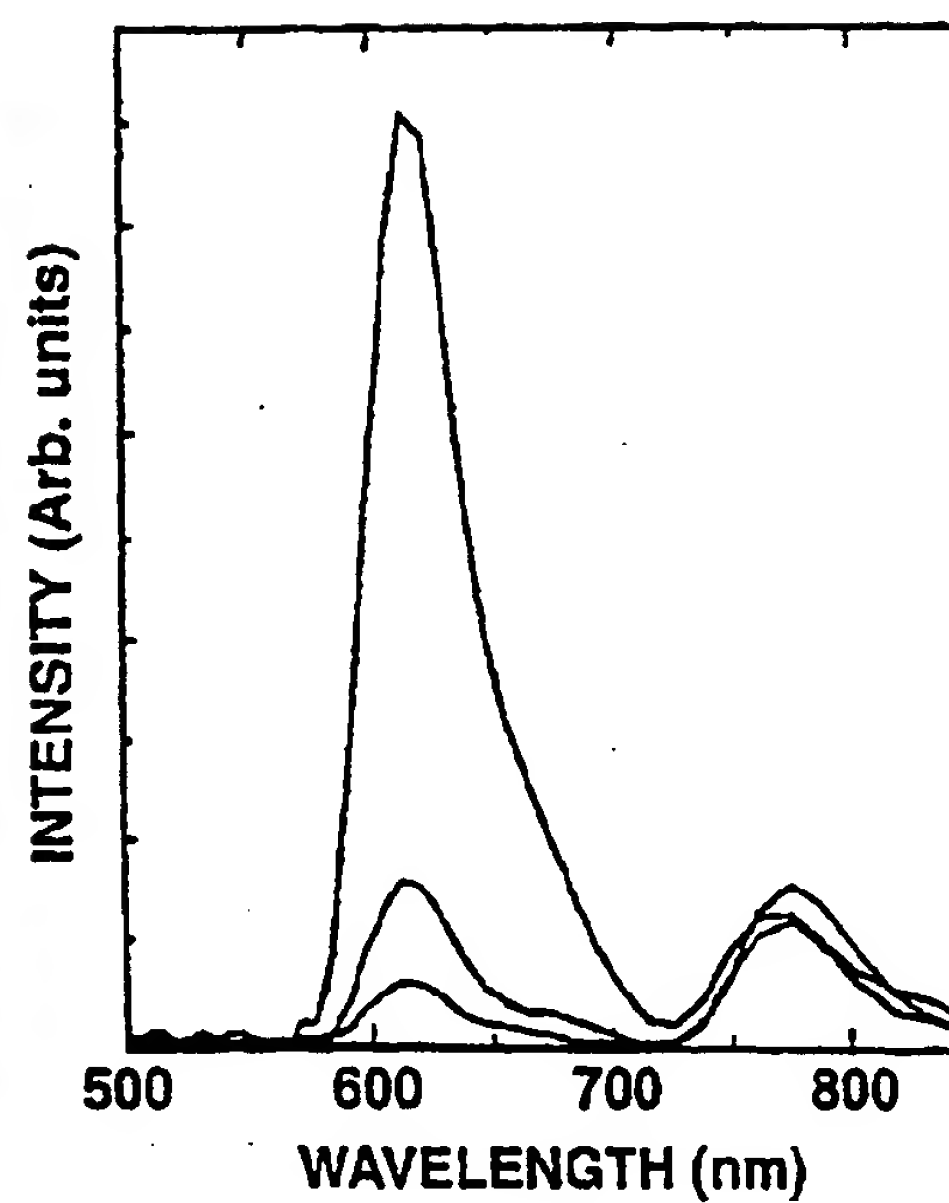


【図 5】

図 5



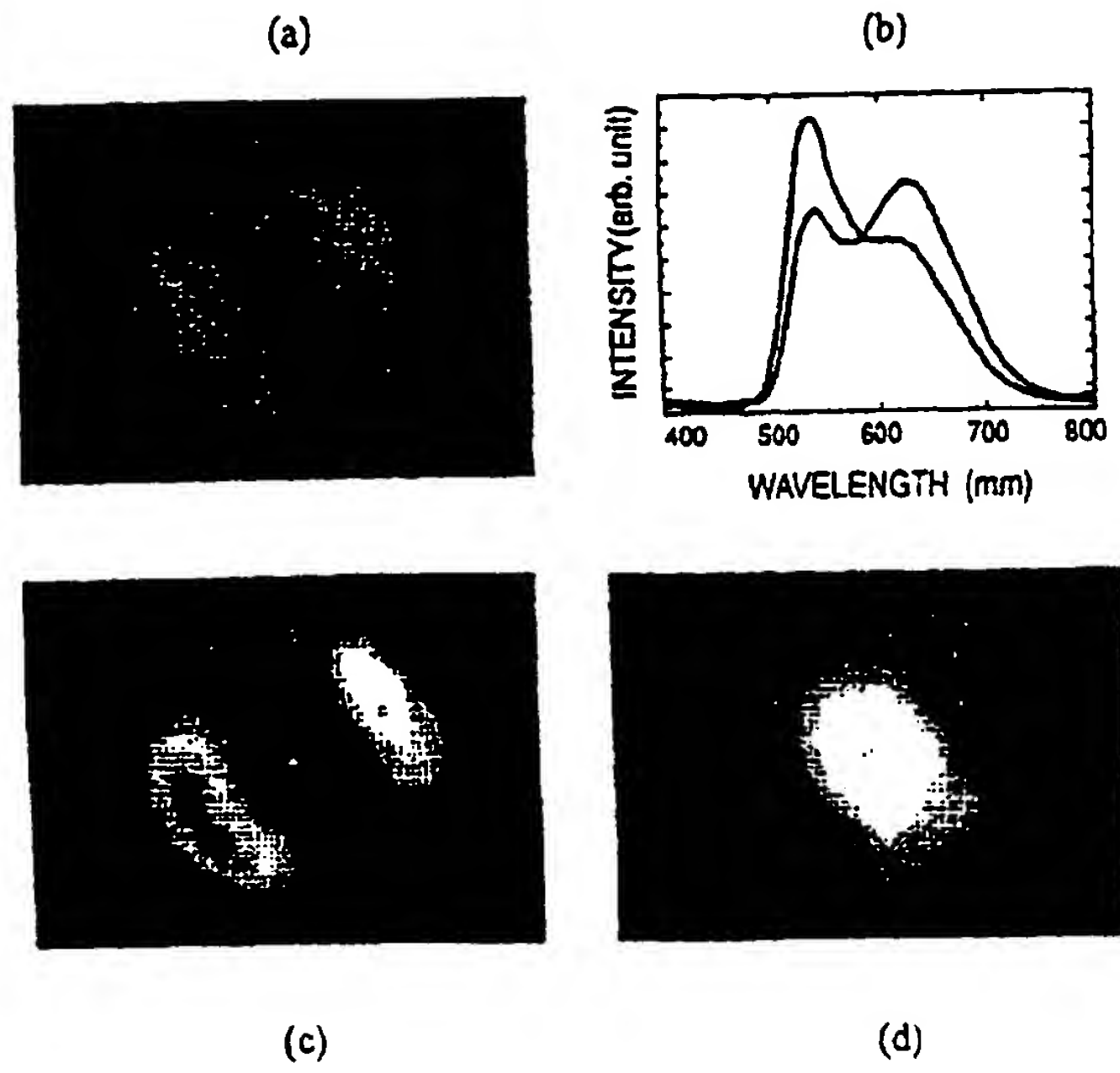
(a)



(b)

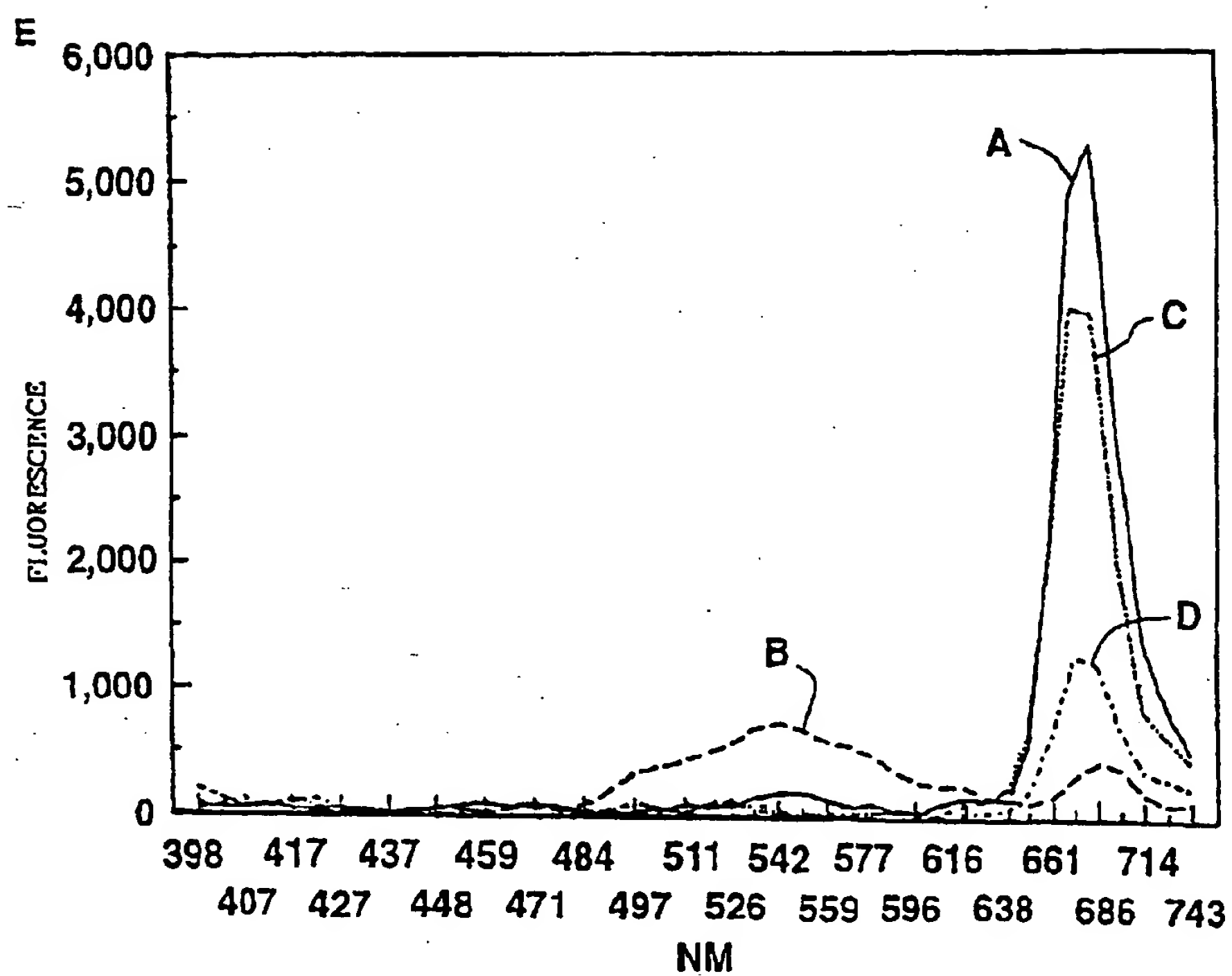
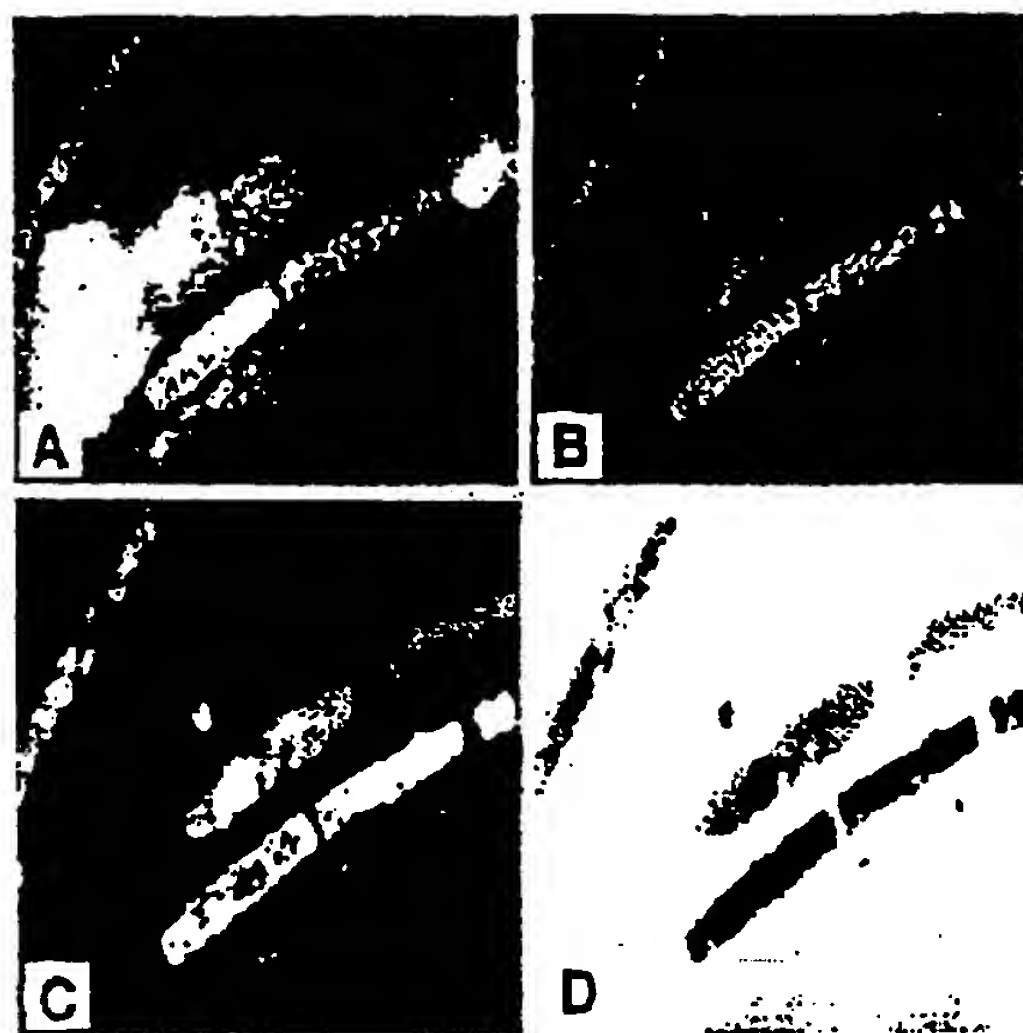
【図6】

図 6



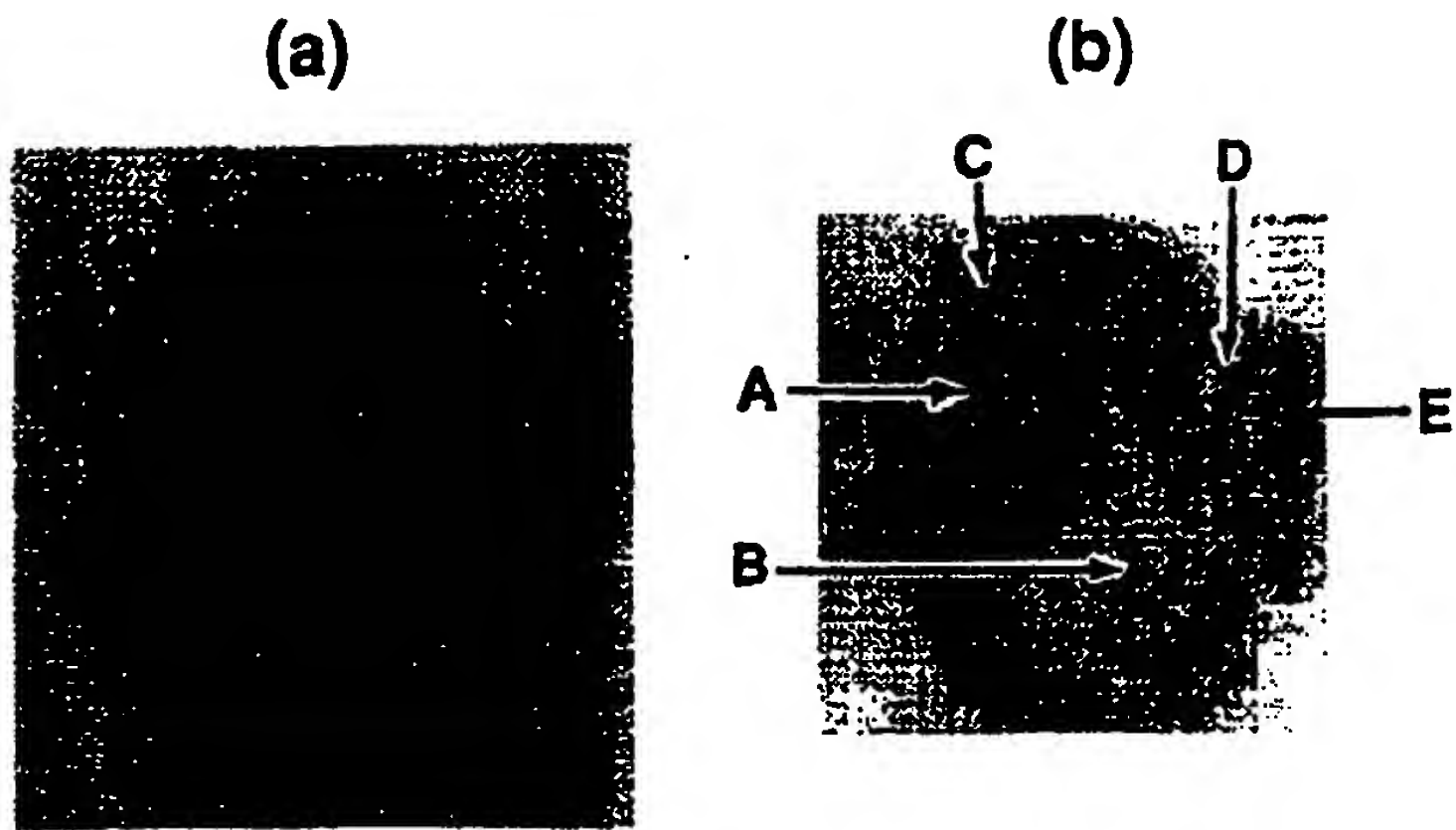
【图7】

图7



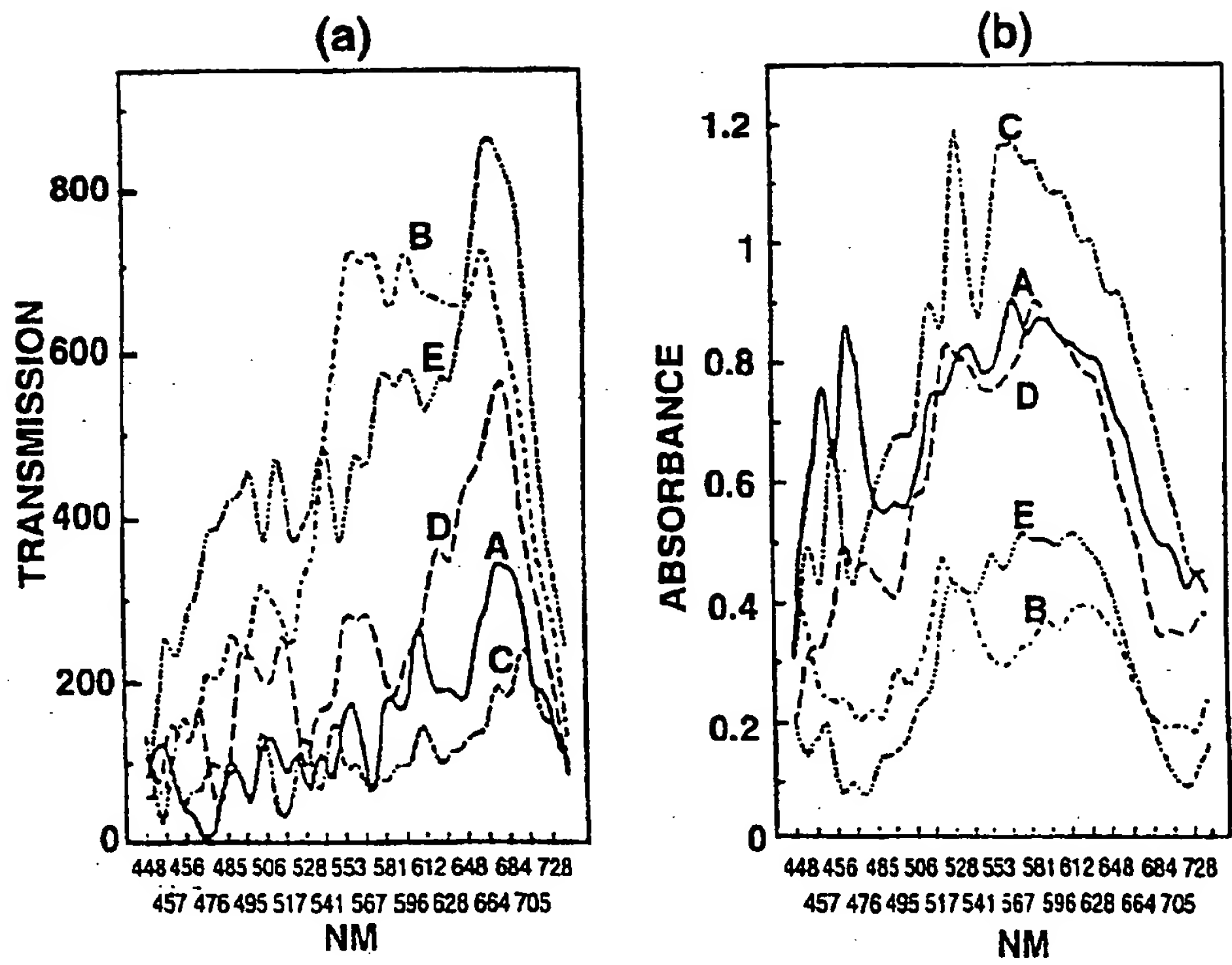
【図8】

図 8



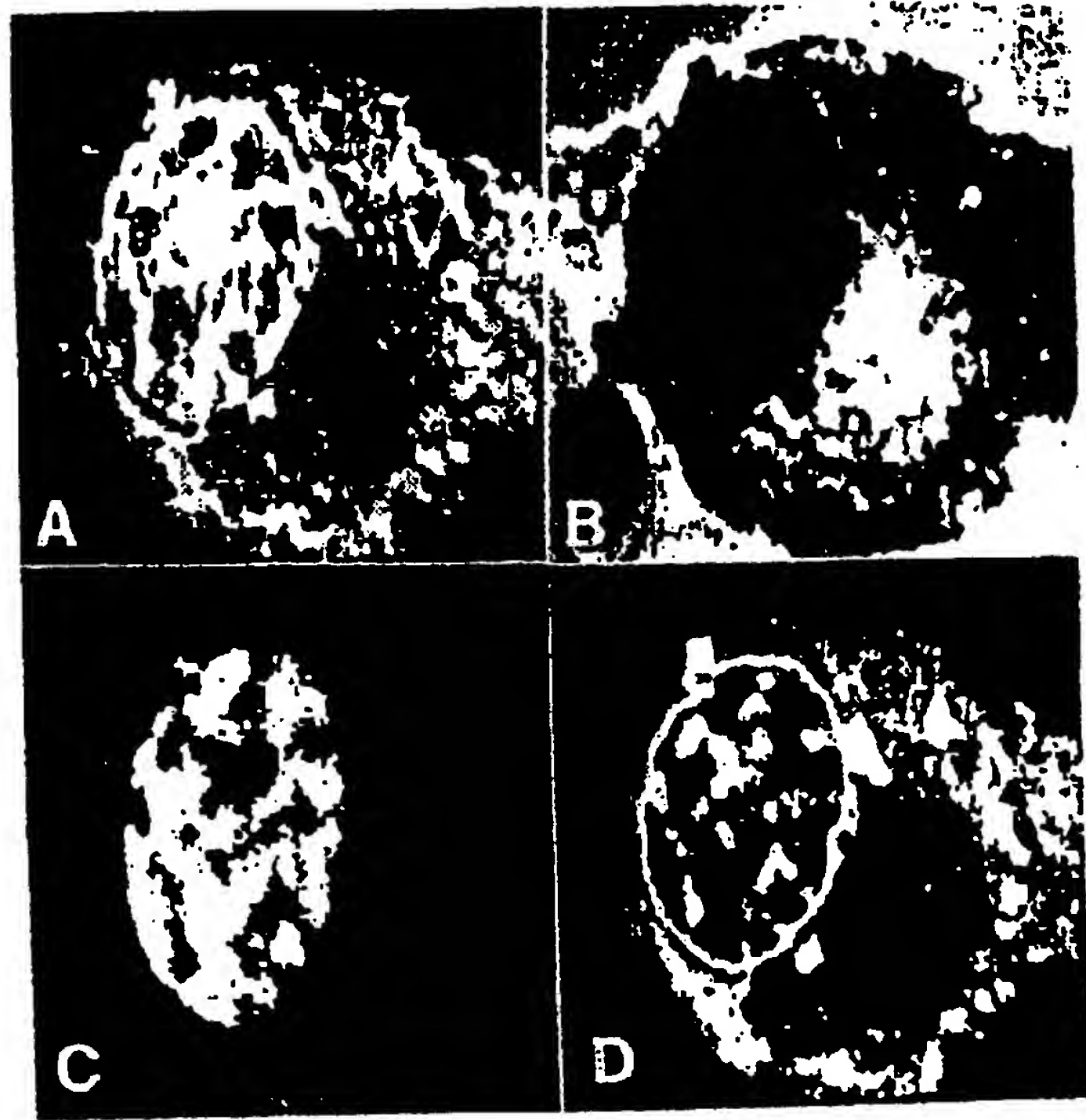
【図9】

図 9



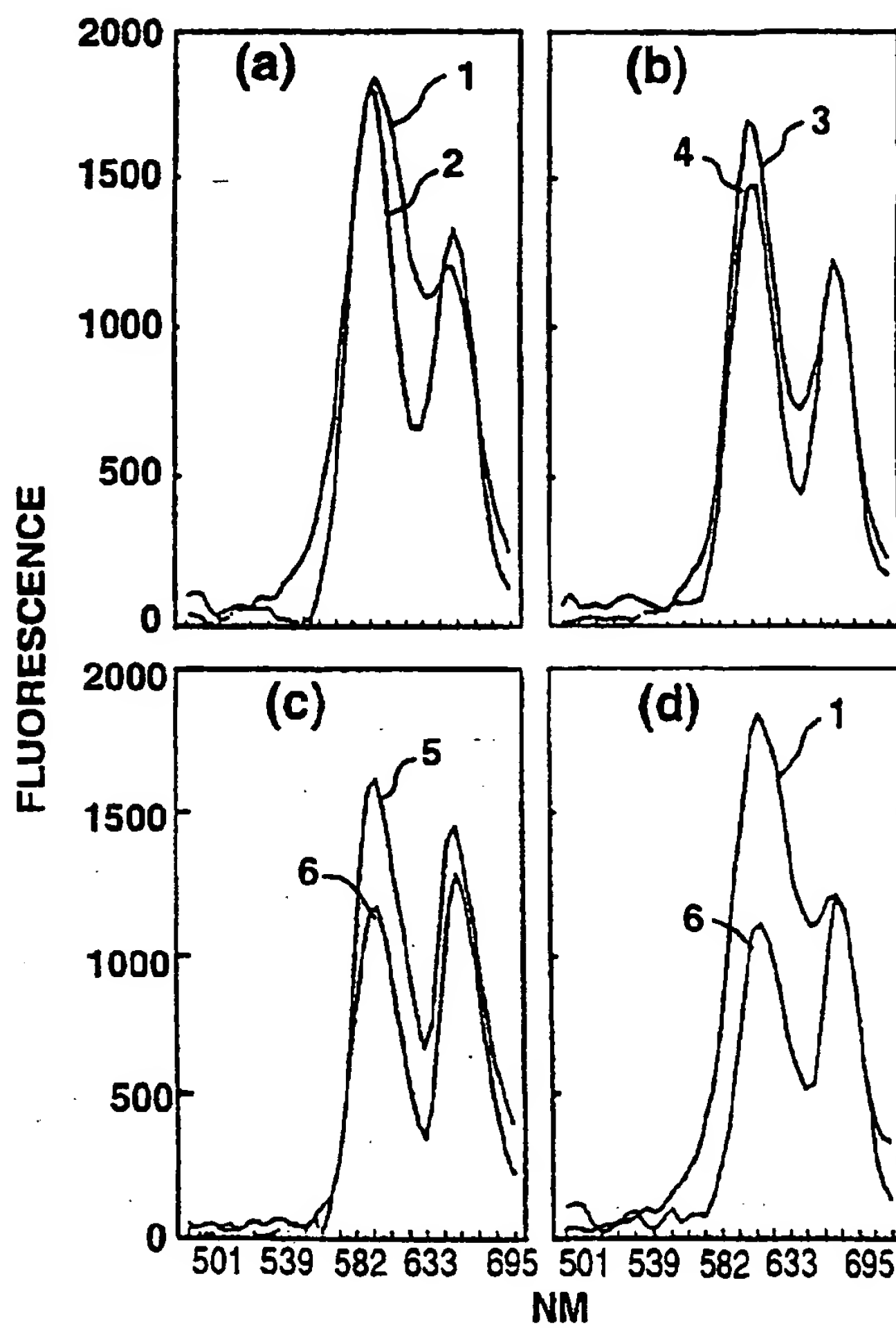
【図10】

図10



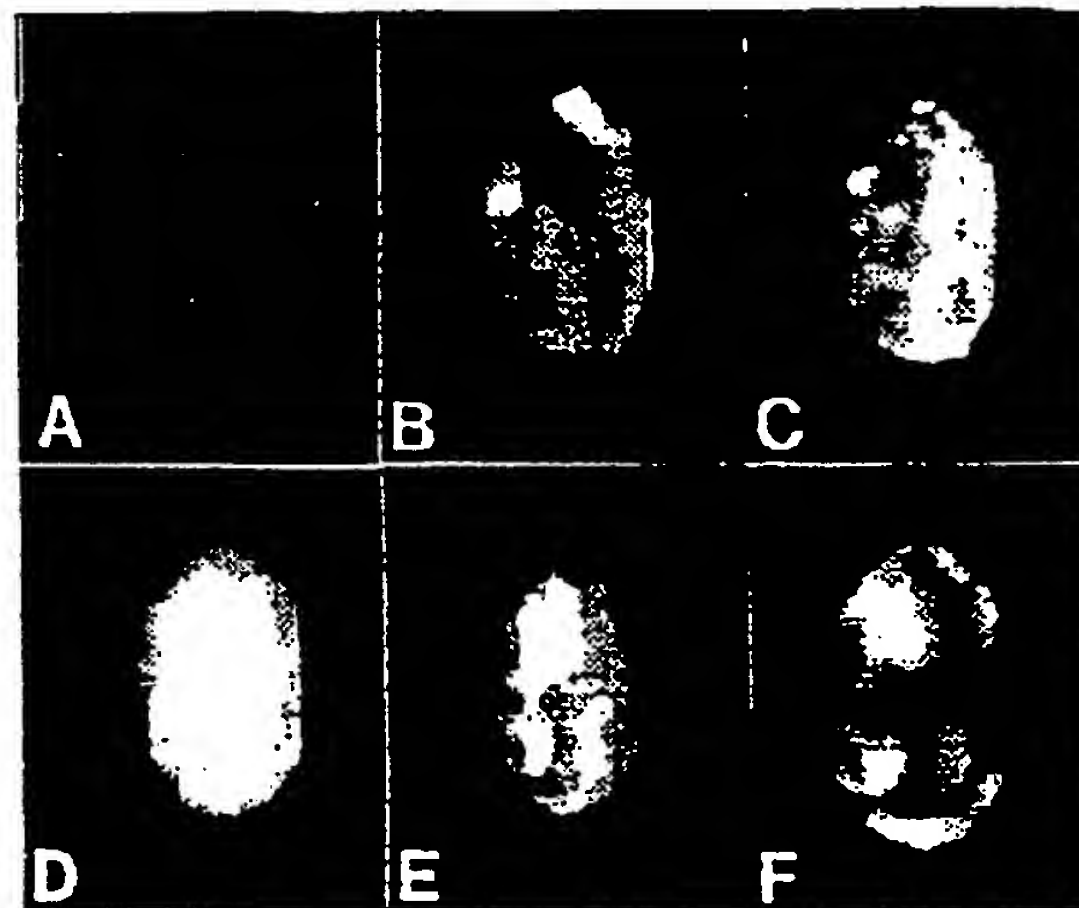
【図 1 1】

図 1 1



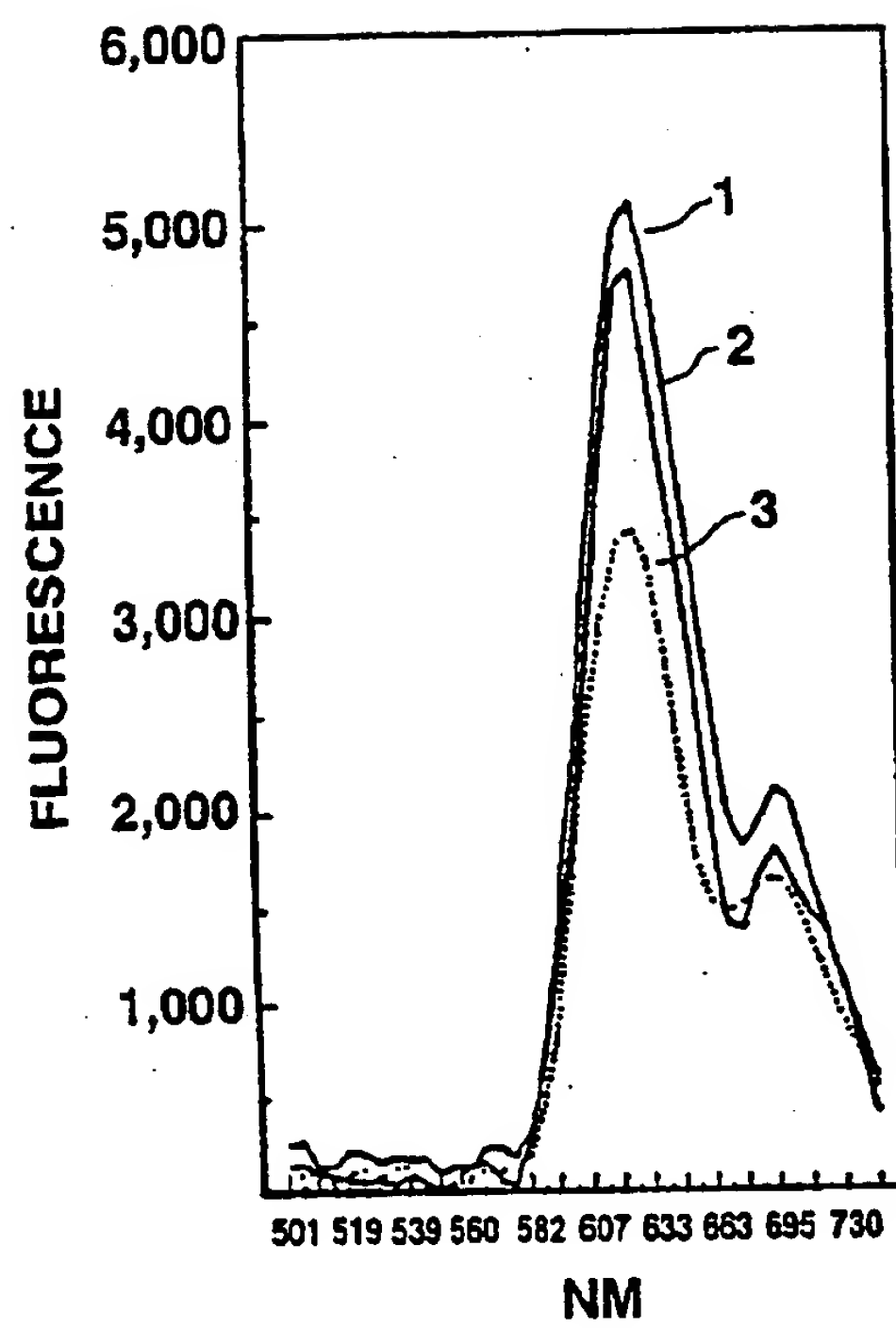
【図12】

図12



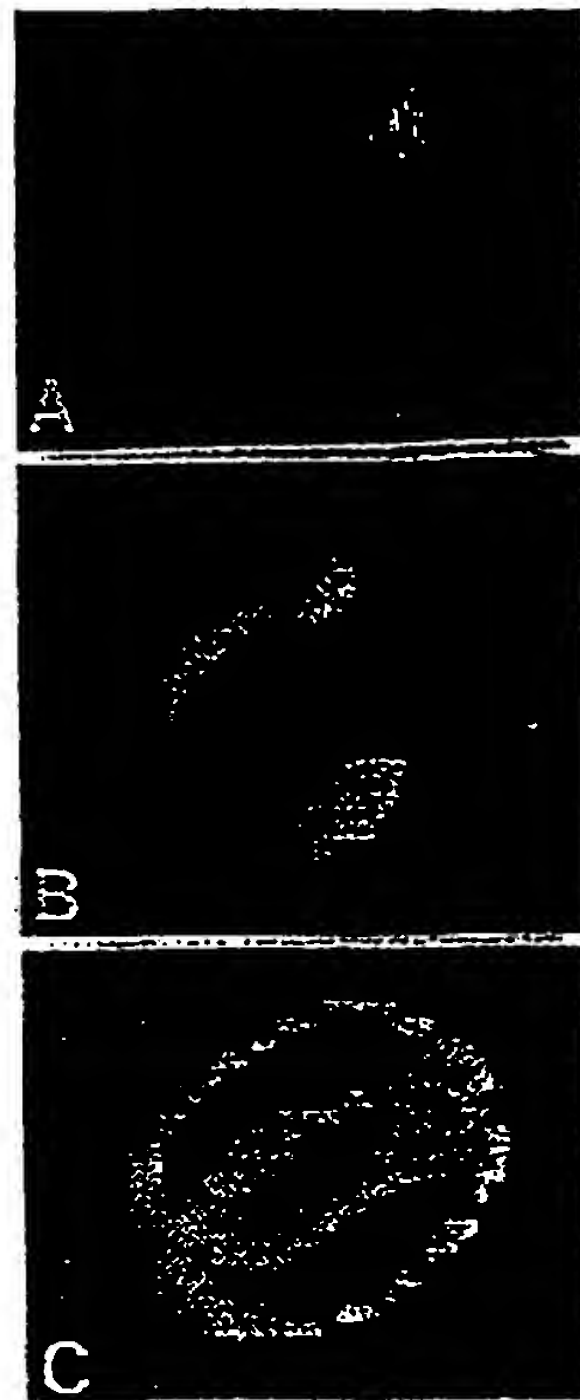
【図13】

図13



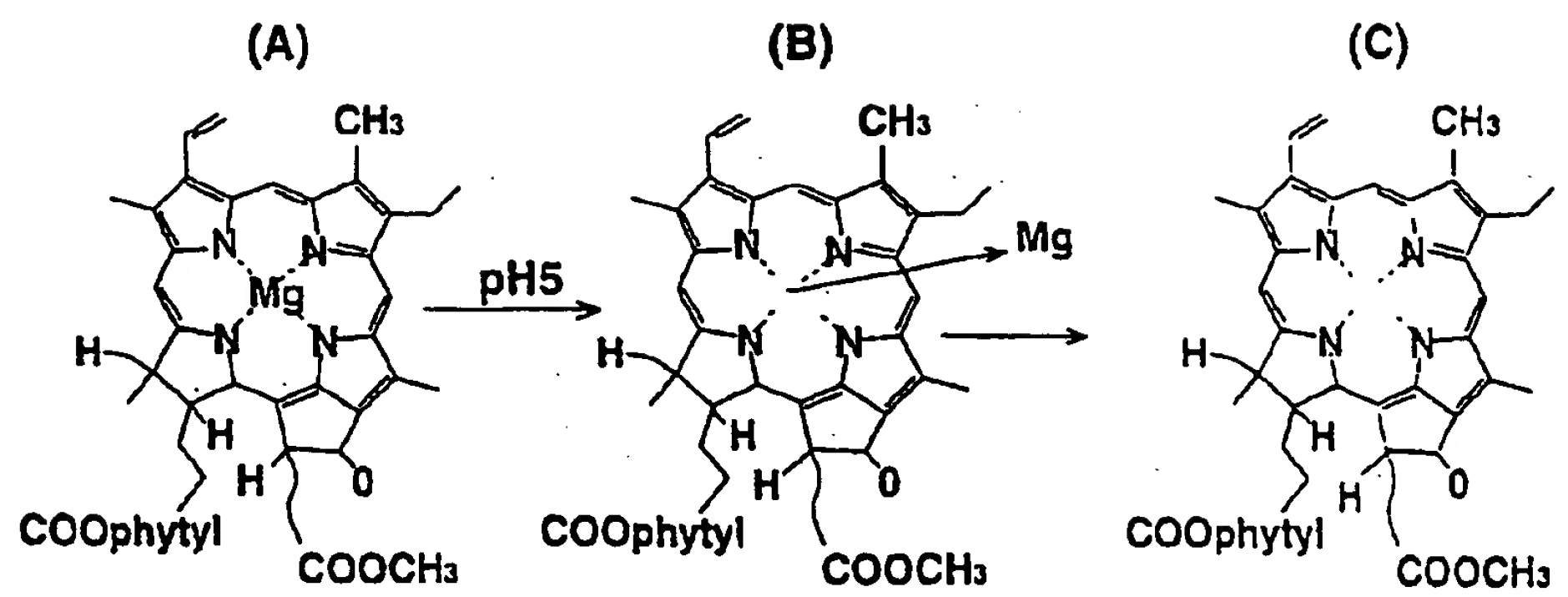
【図14】

図14



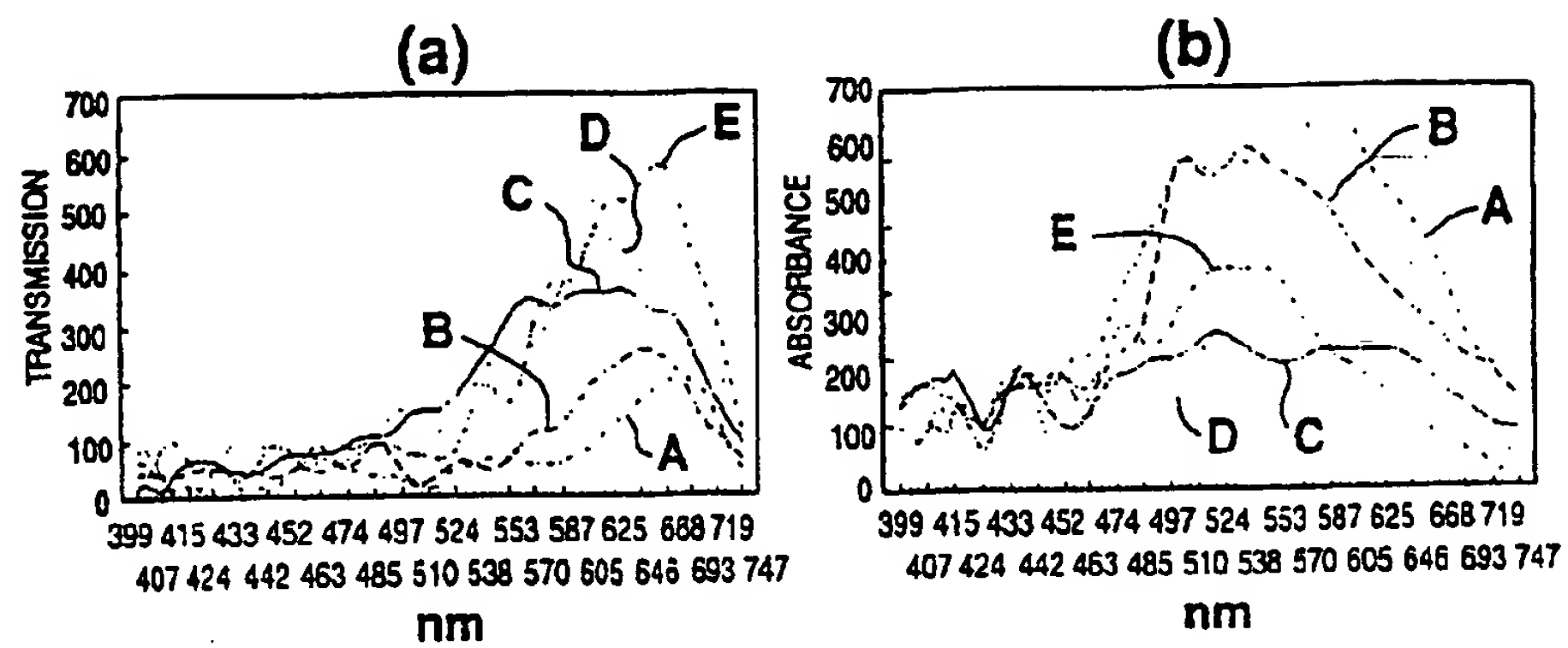
【図15】

図15



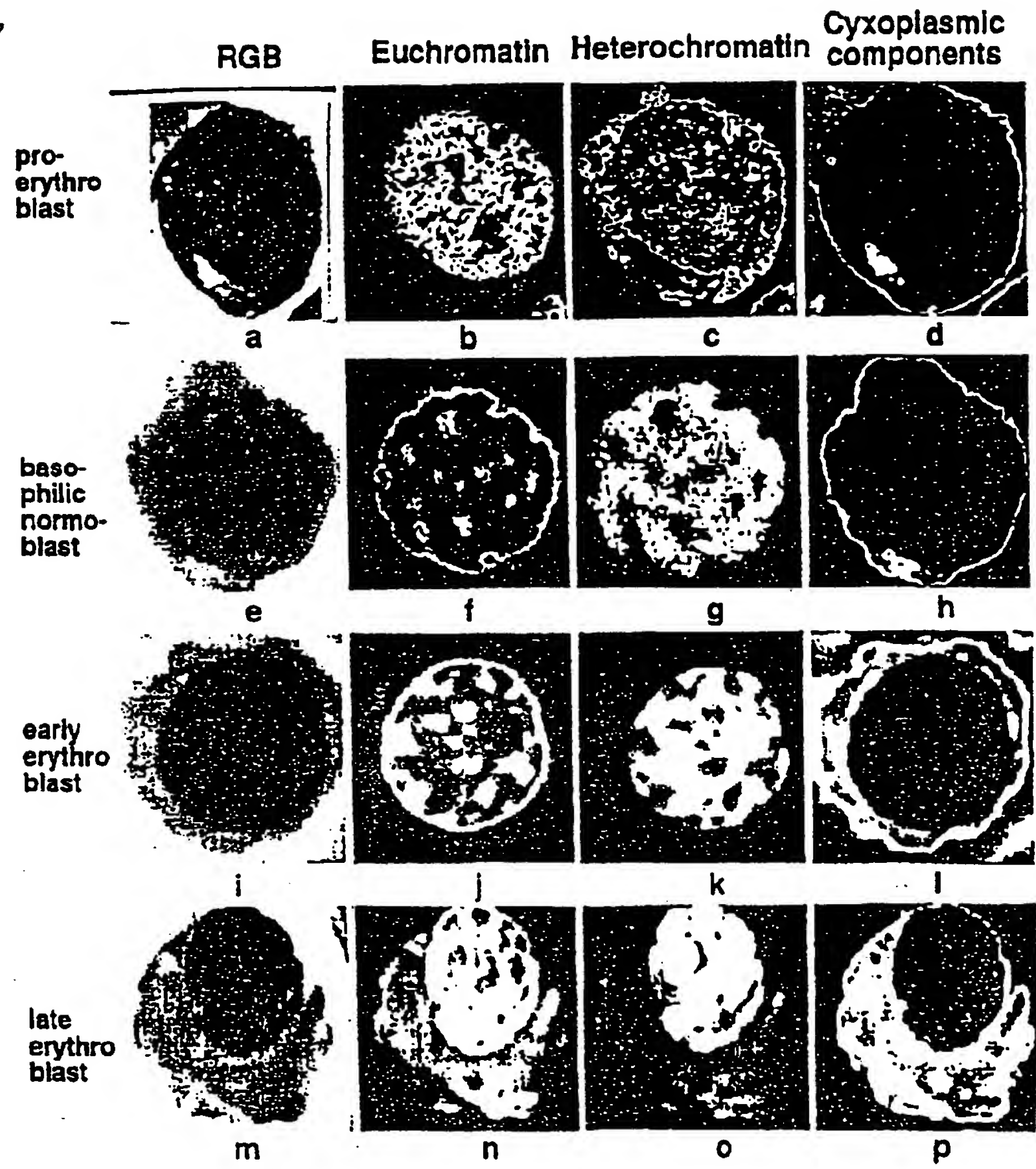
【図16】

図 16



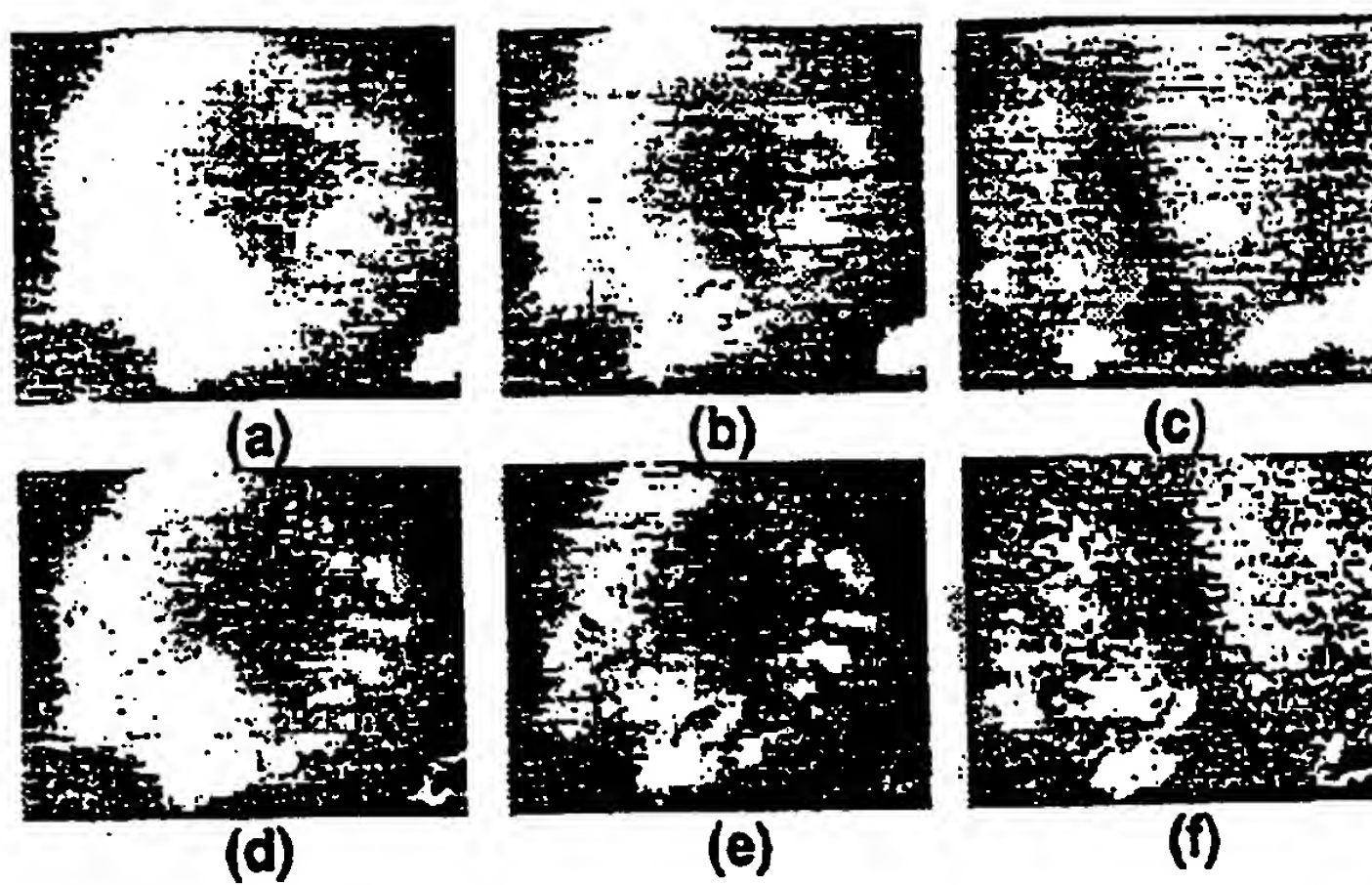
【図 17】

図 17



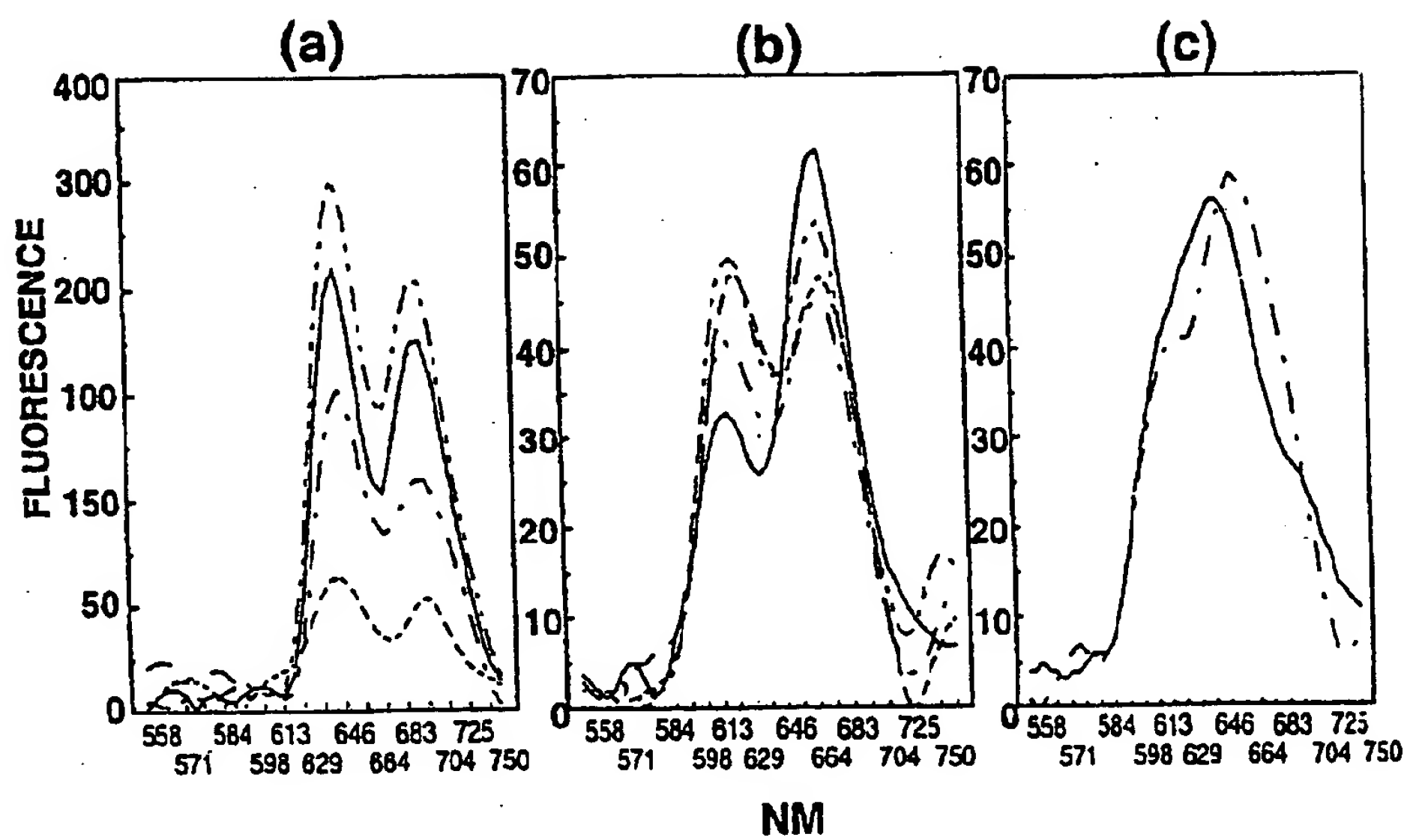
【図18】

図18



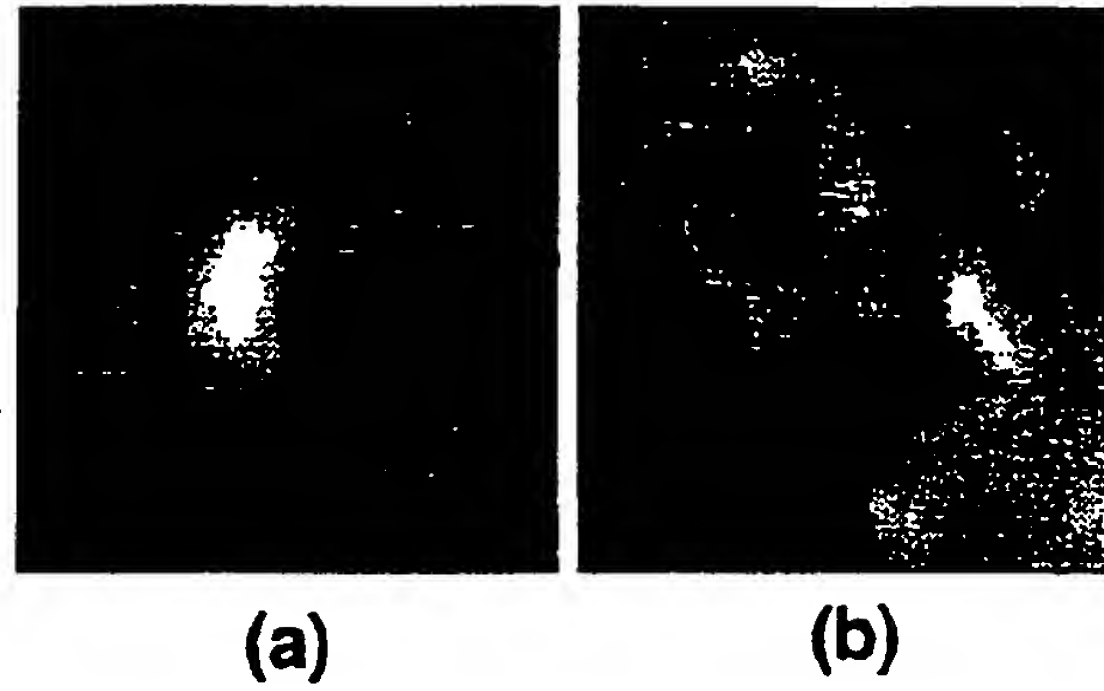
【図19】

図19



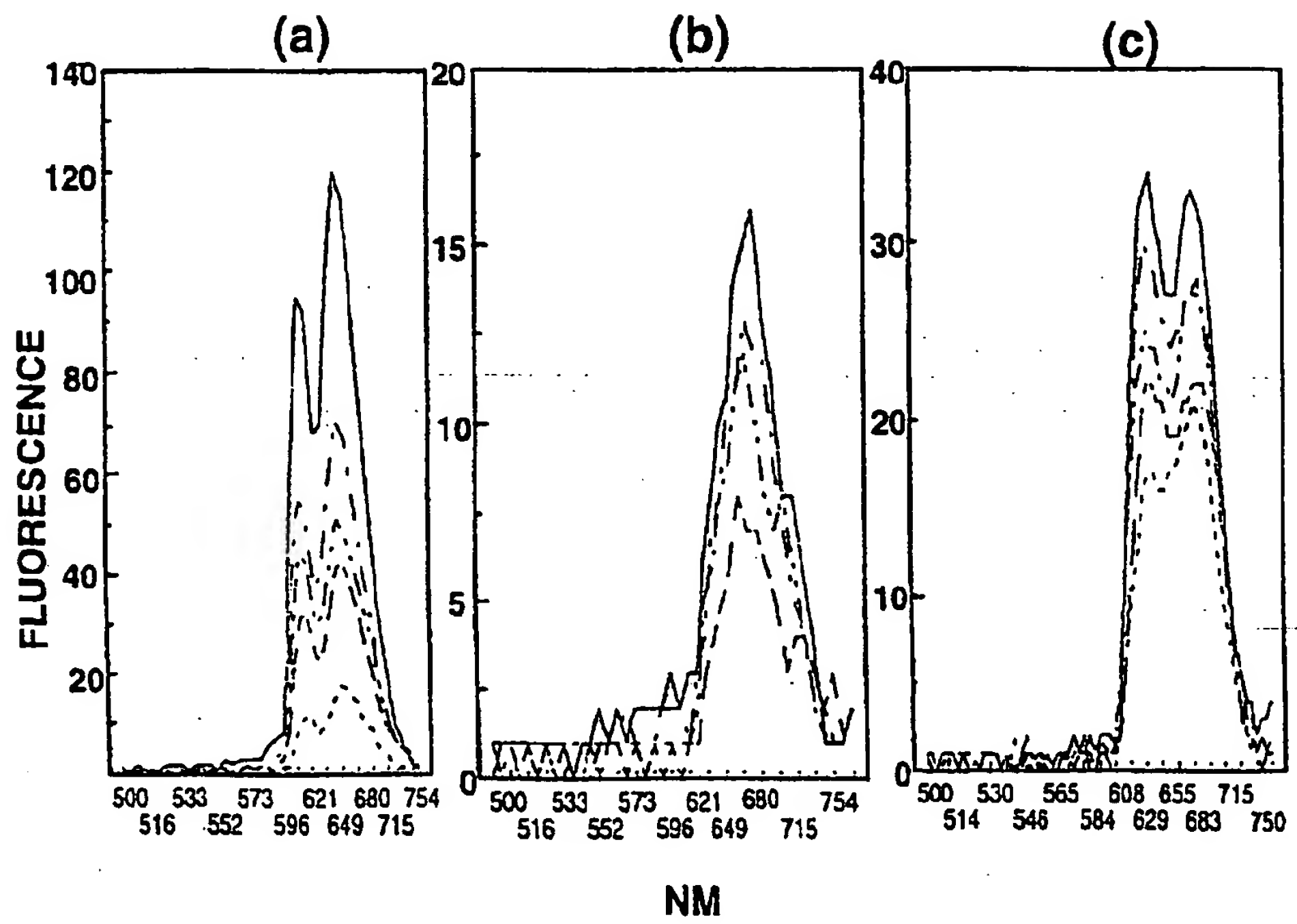
【図20】

図 2 0



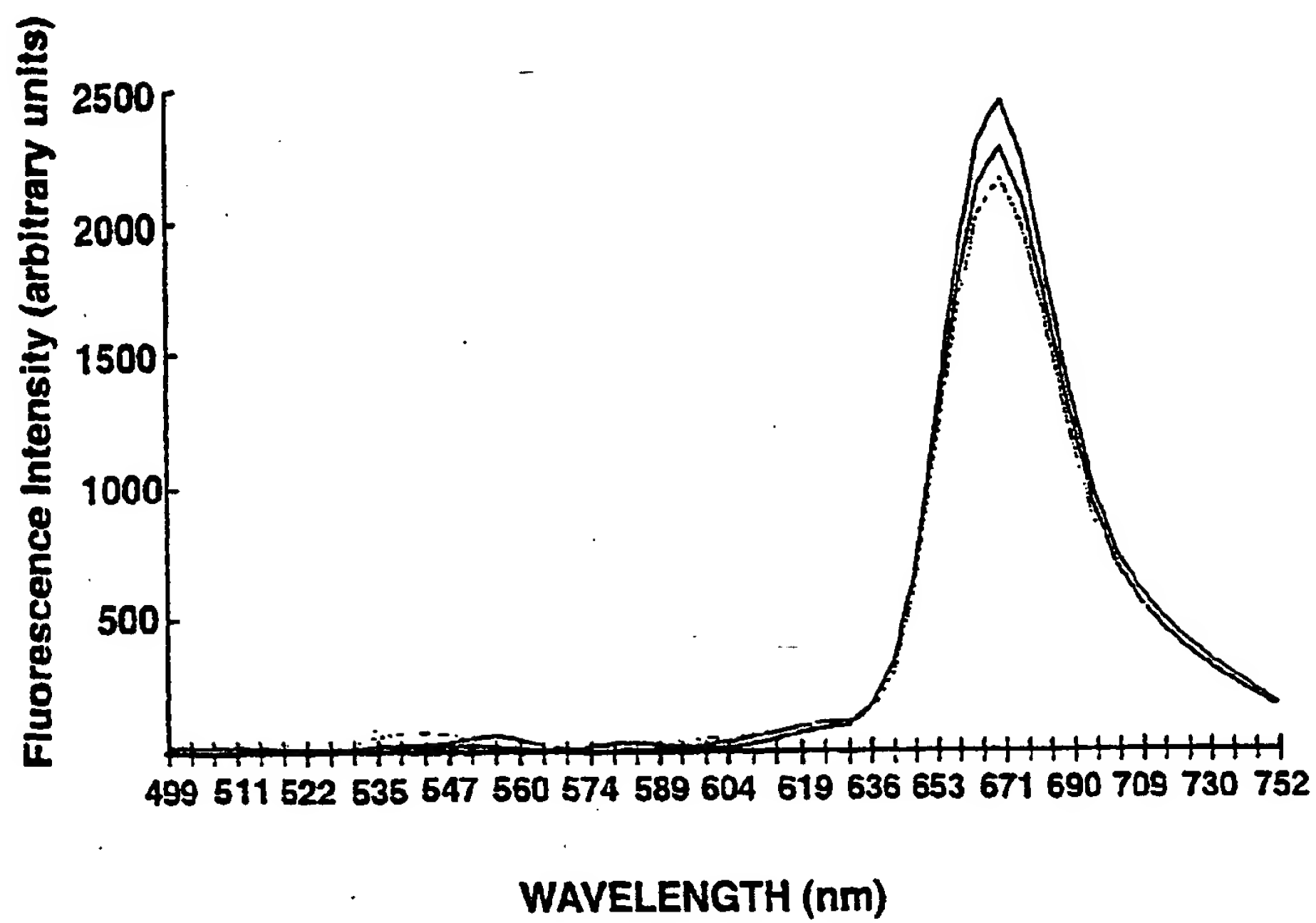
【図21】

図 2 1

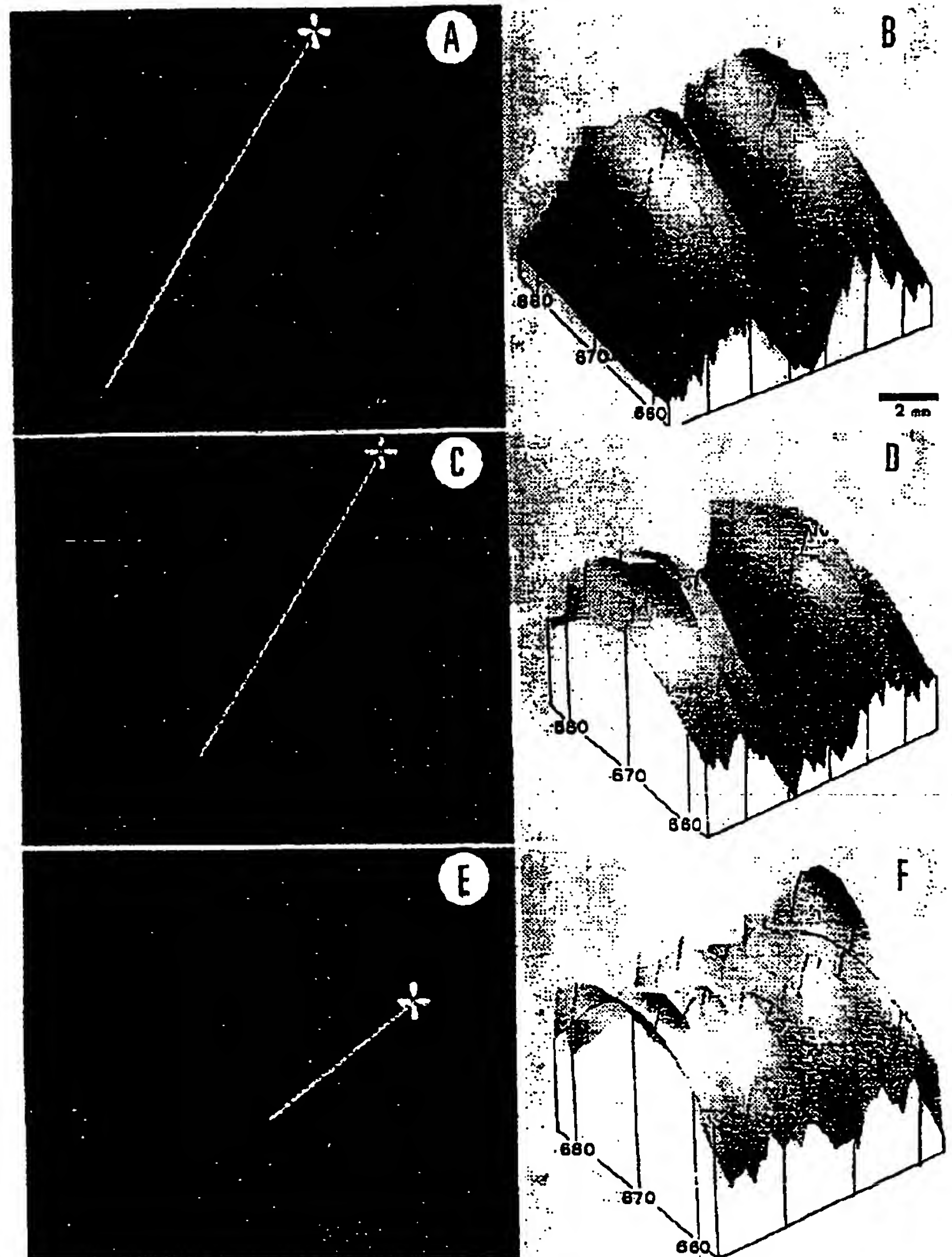


【图22】

图22

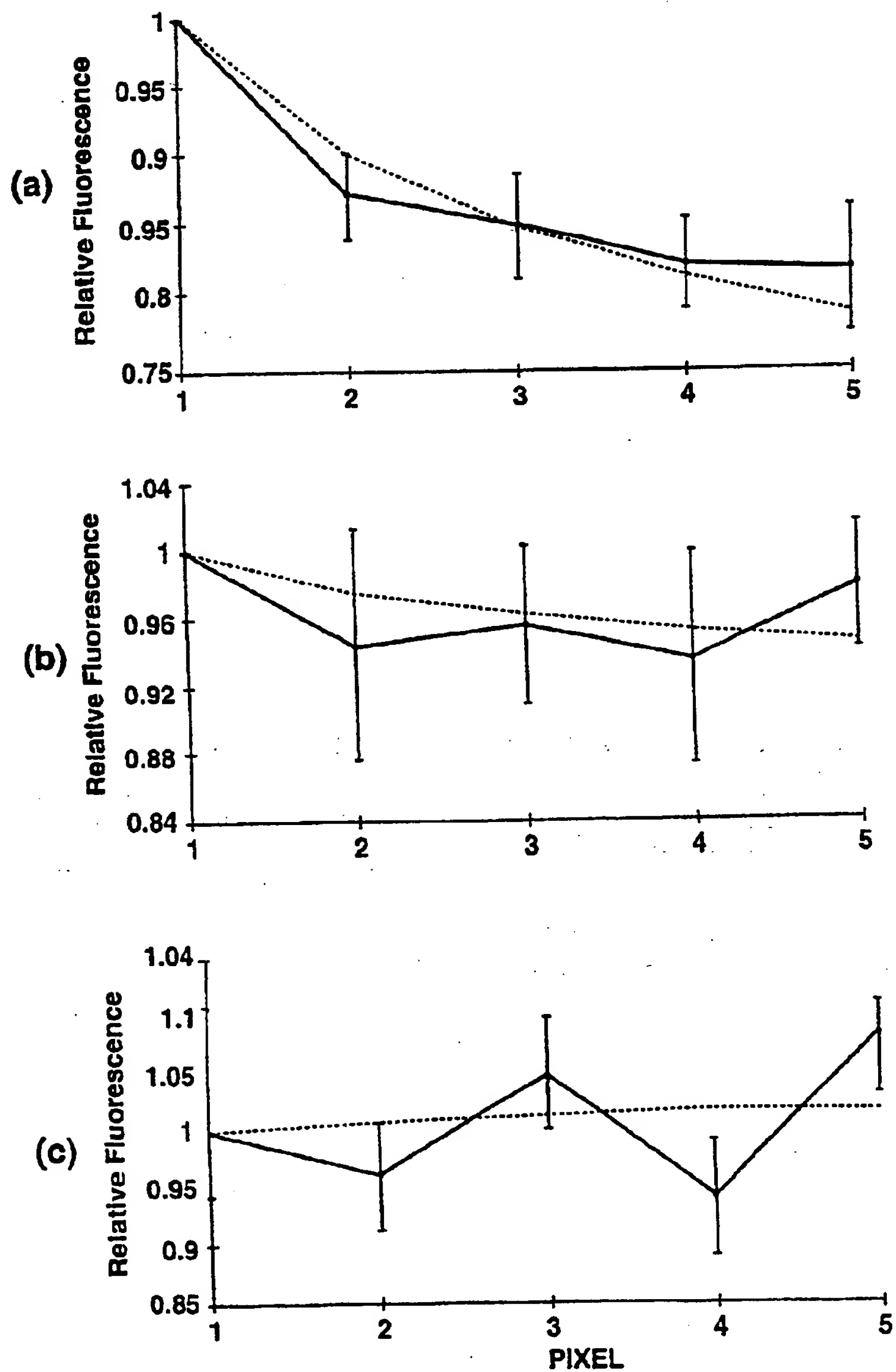


【图23】
图 2 3



【图 24】

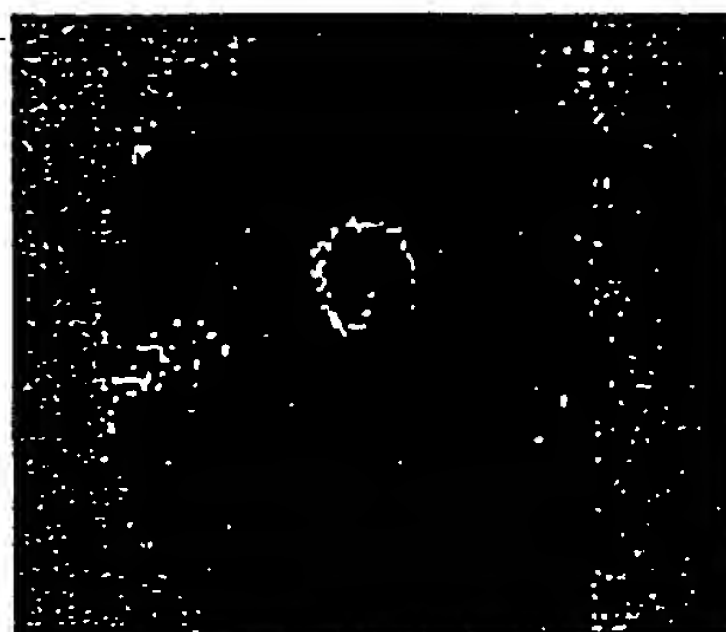
图 24



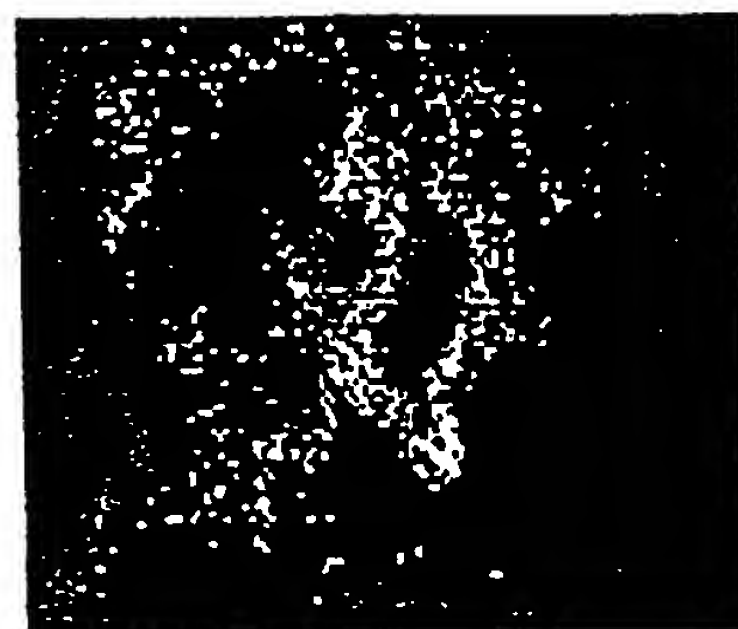
【図25】

図 25

(a)



(b)

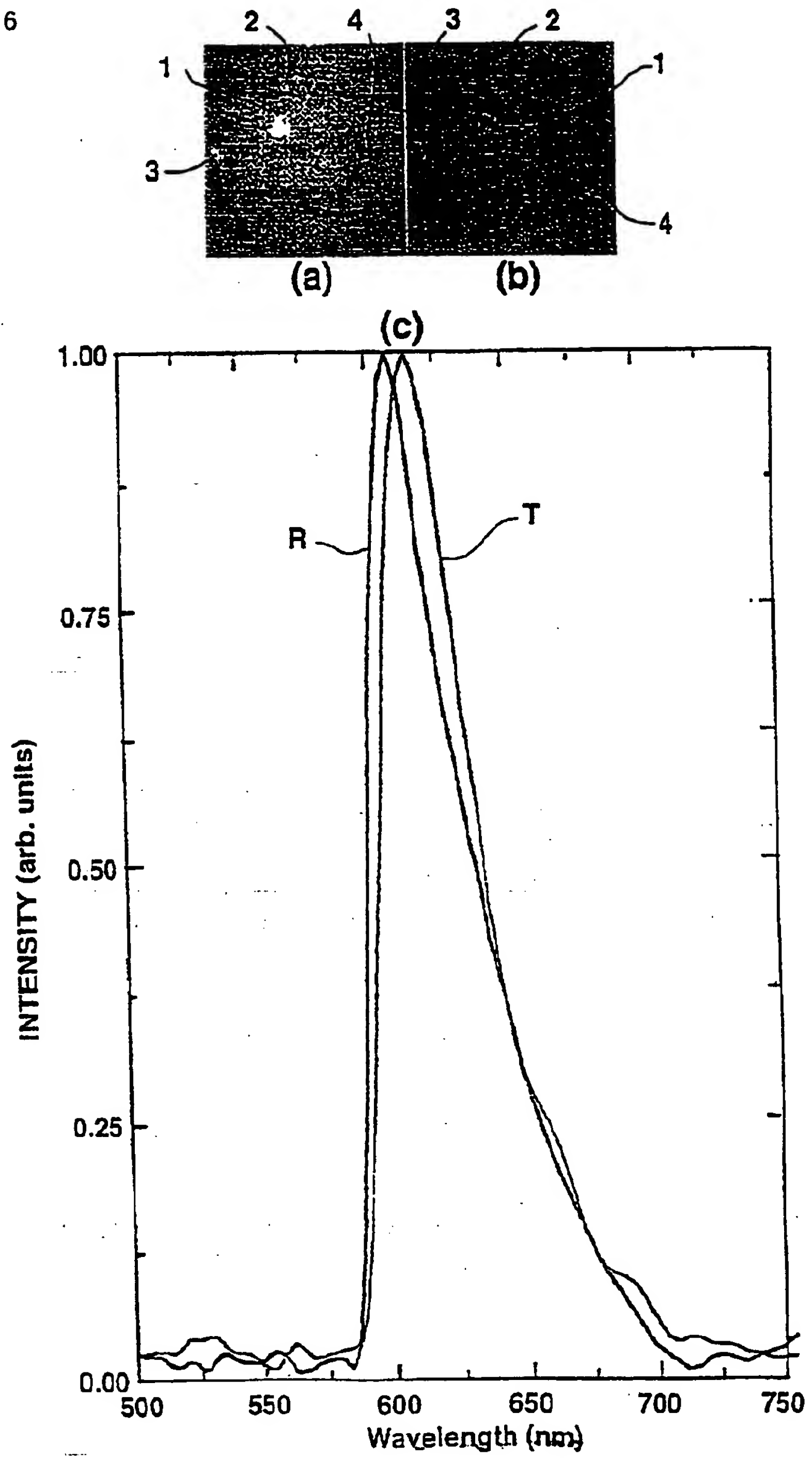


(c)



【図26】

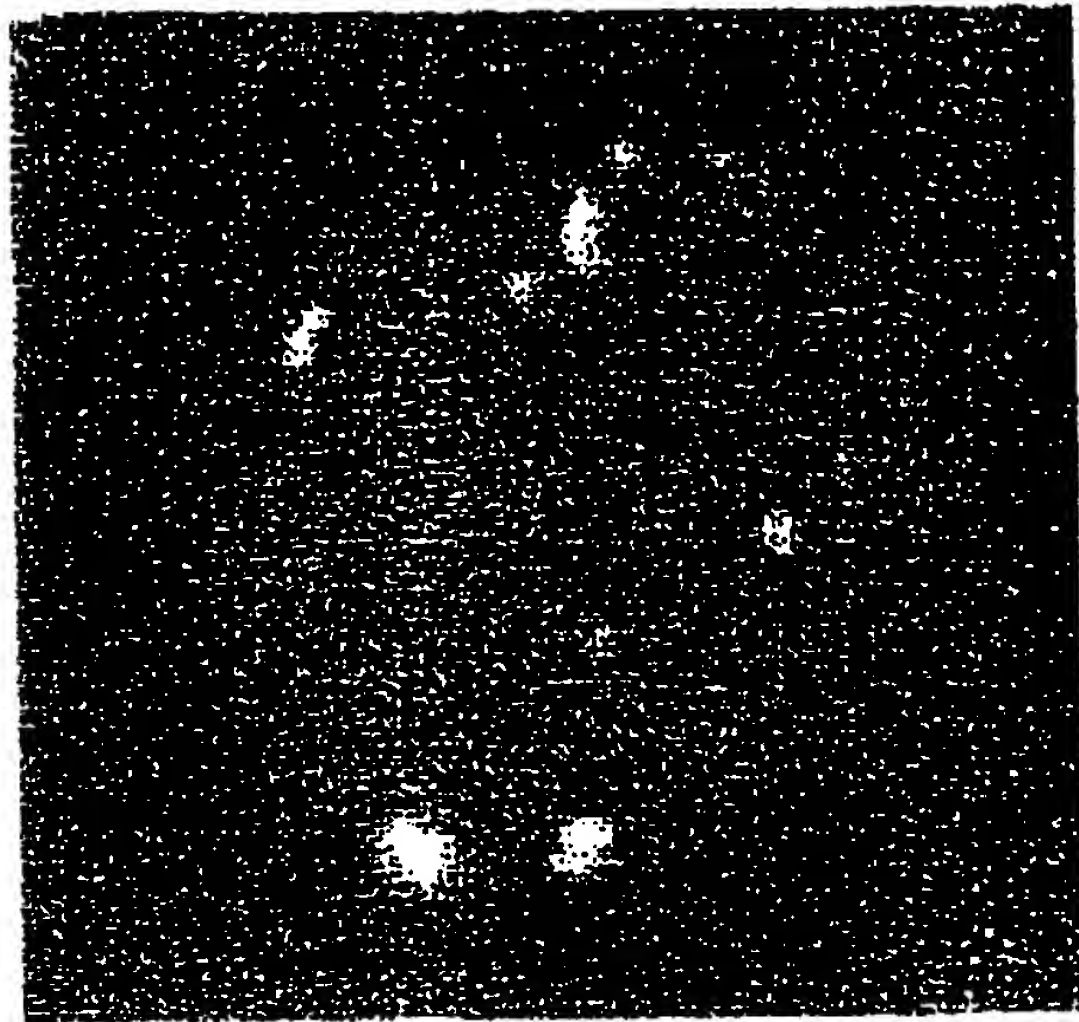
図26



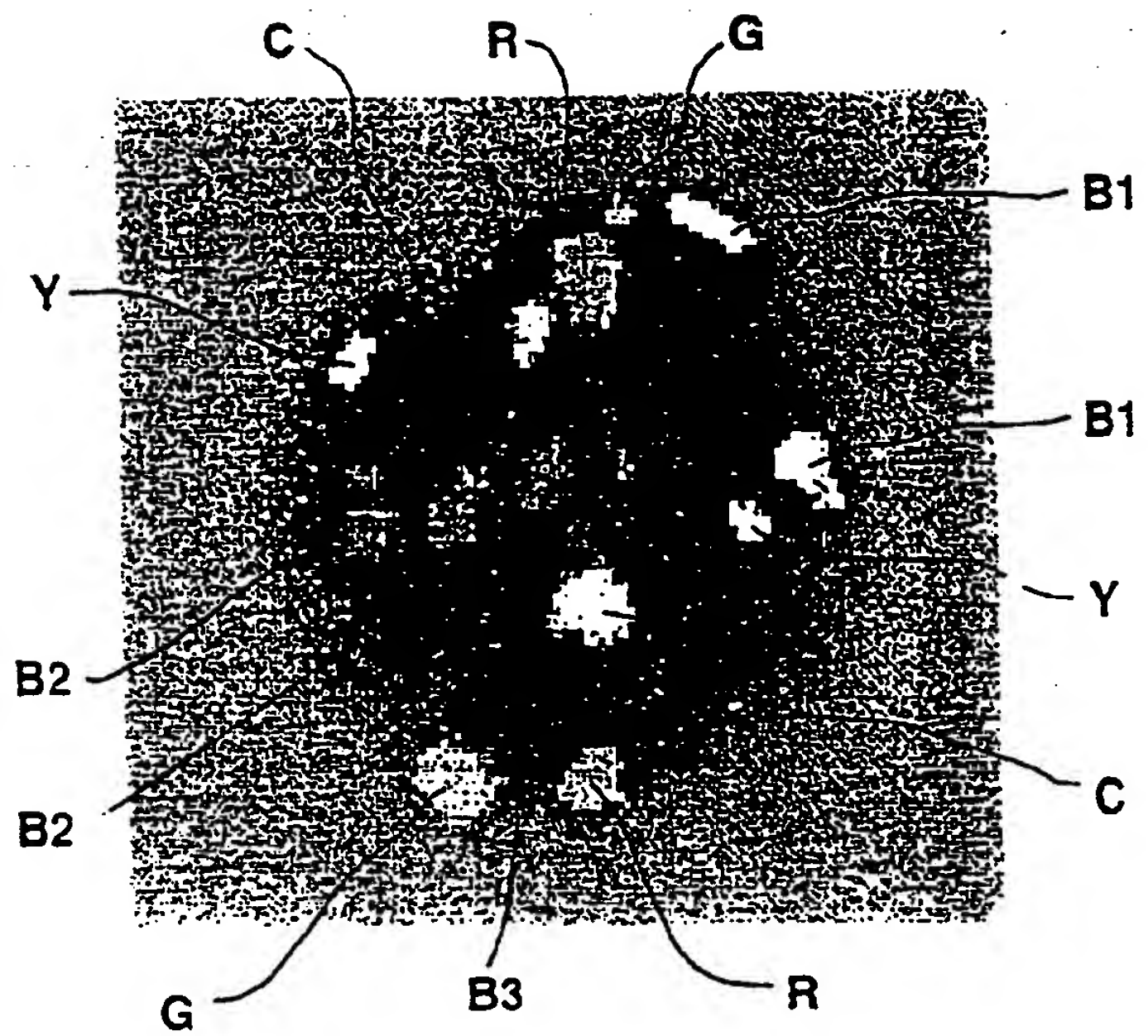
【図27】

図 2 7

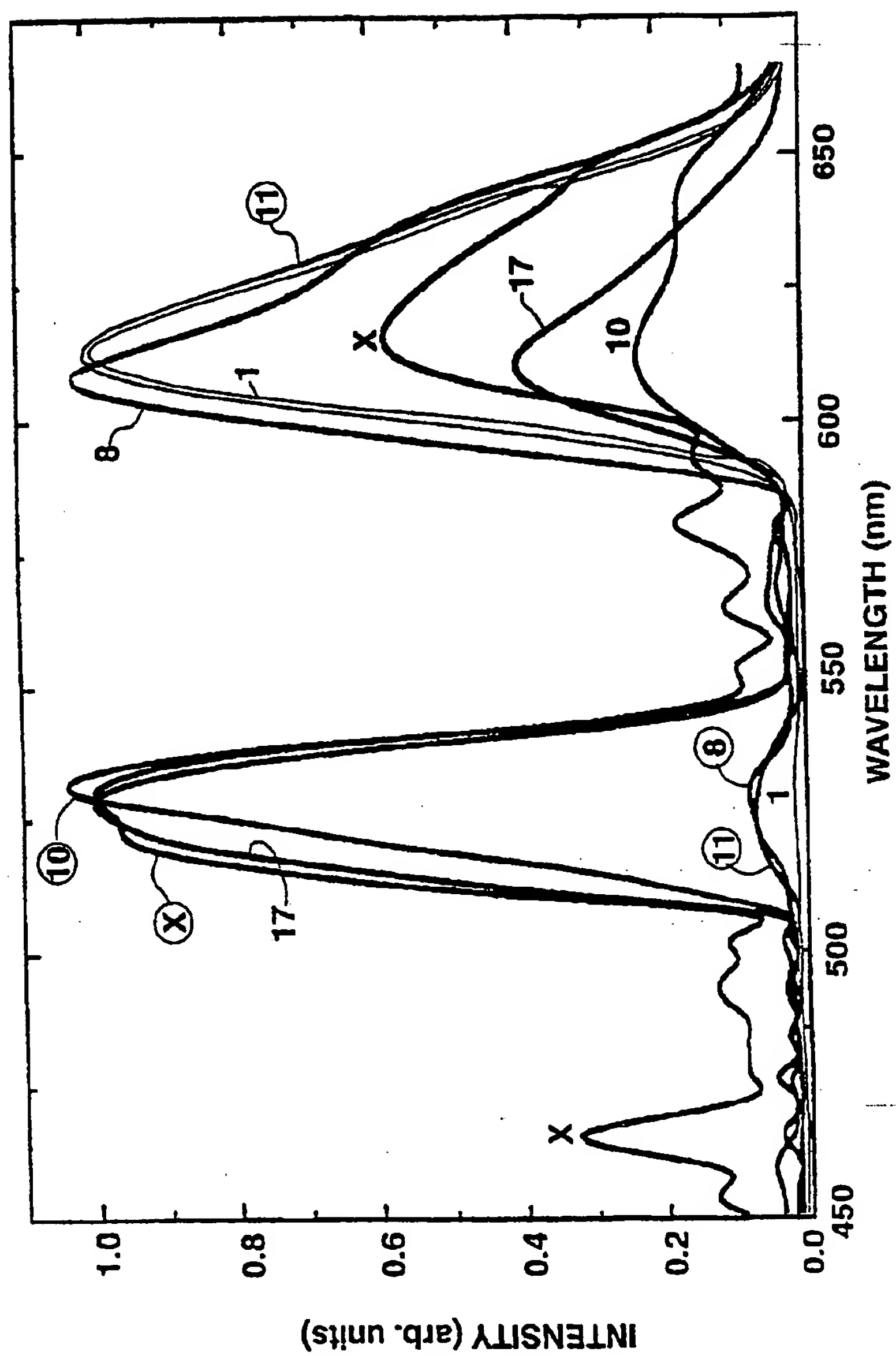
(a)



(b)

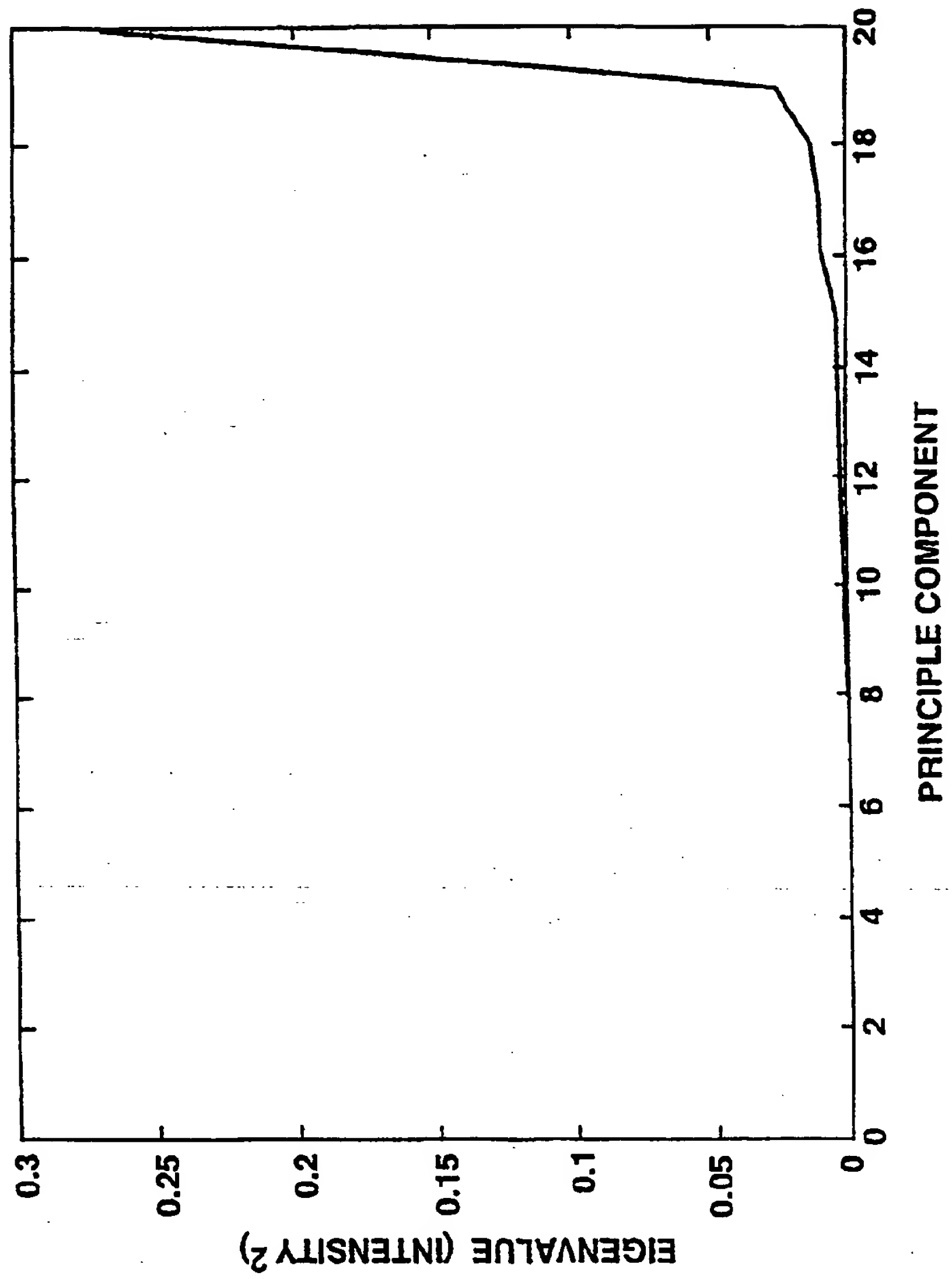


【図 27】
図 27 c



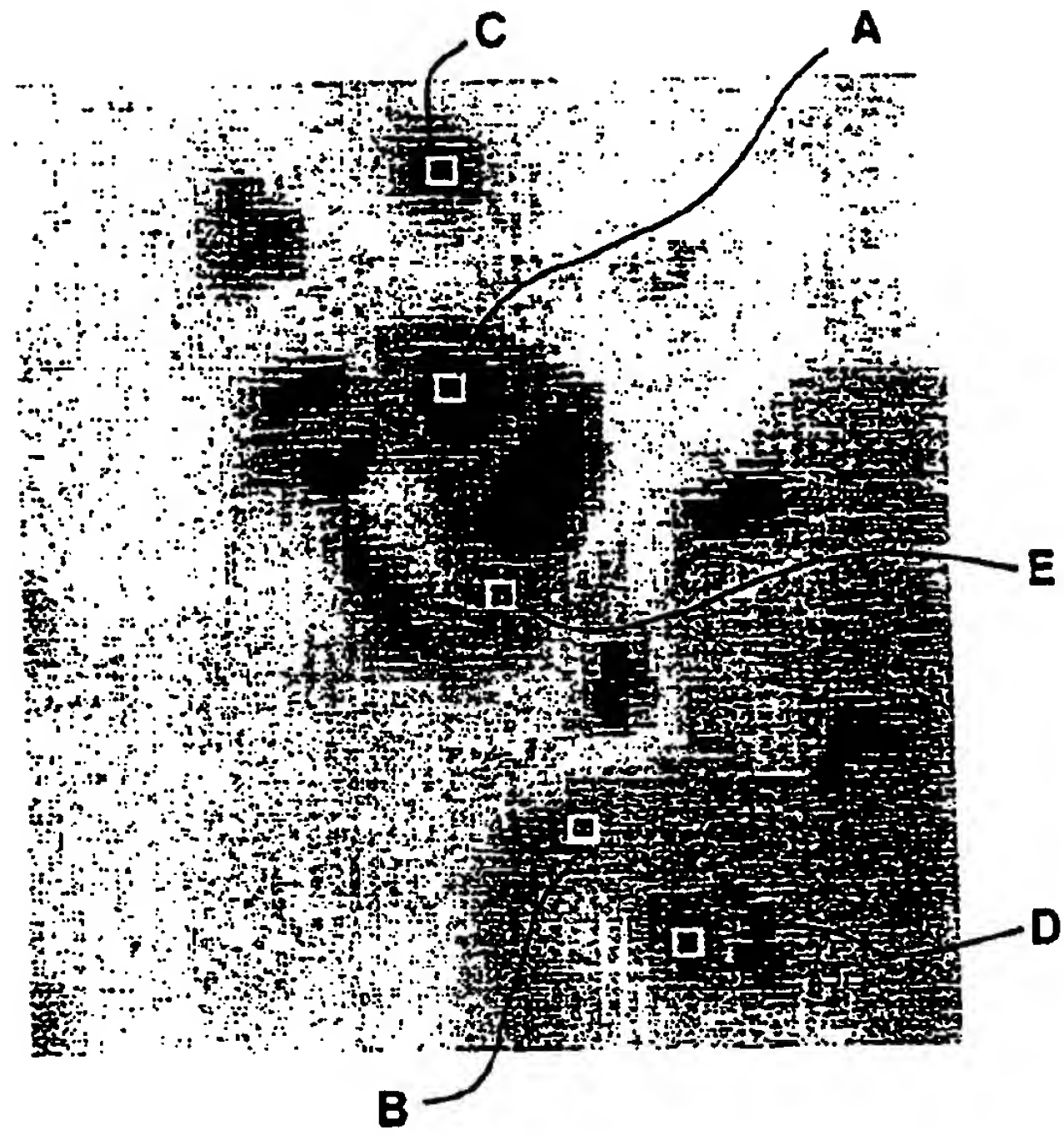
【図 29】

図 29



【図28】

図 28



【図30】

図30a



【図30】

図30b

p10

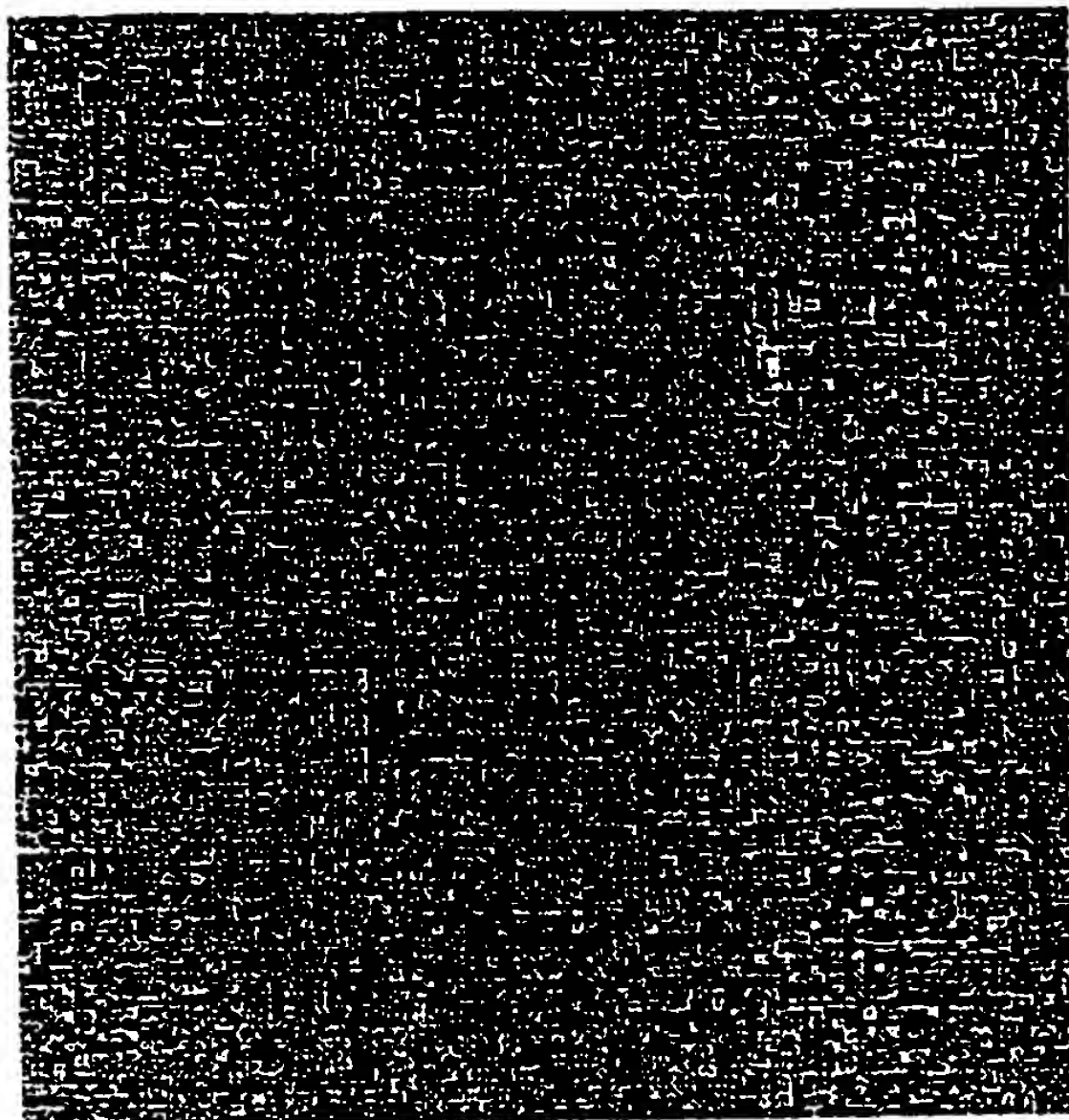
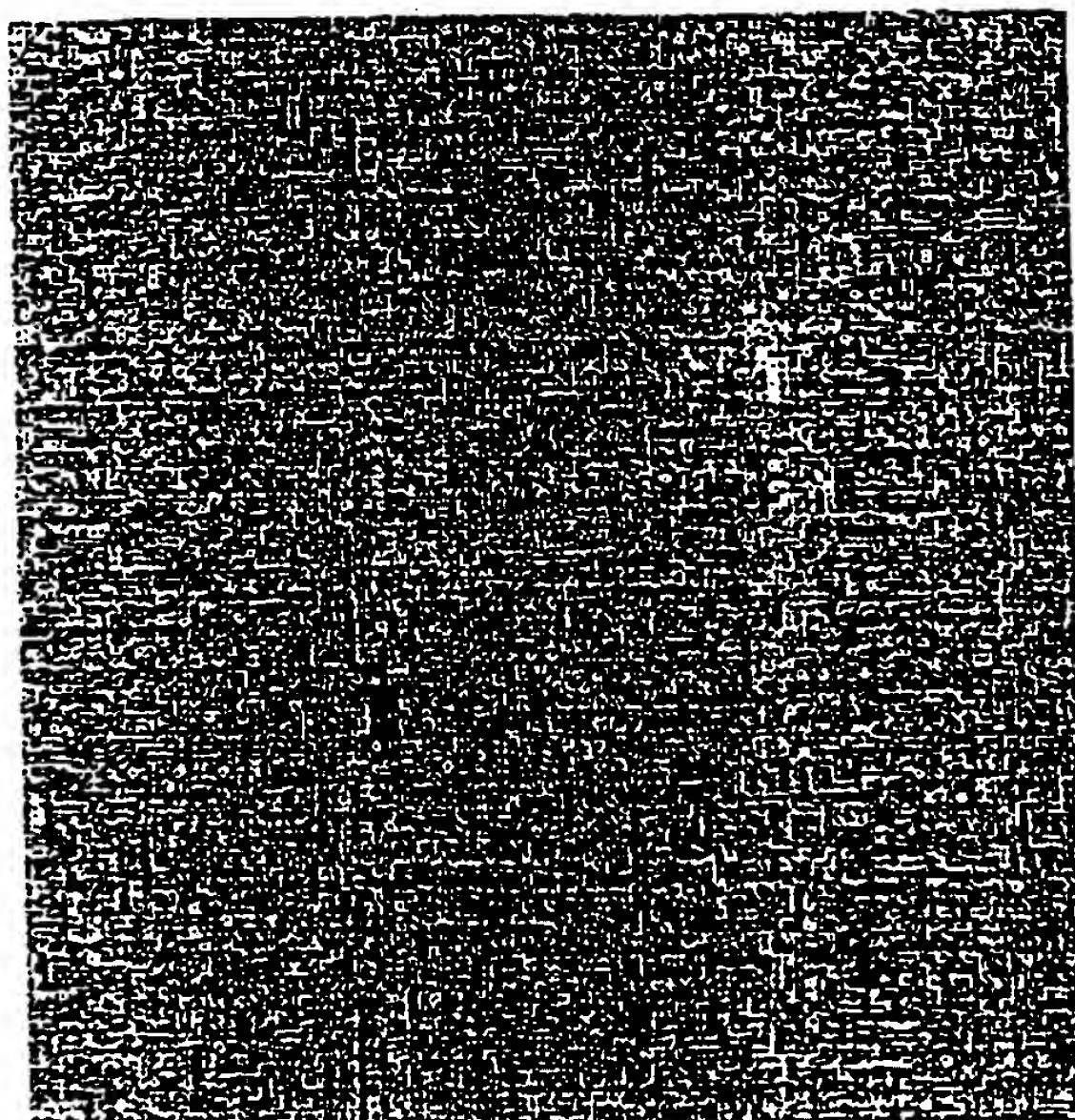


図30c

p13



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/20024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
IPC(6) : G01B 9/02 US CL : 356/346; 382/133; 250/461.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 356/346, 300, 326; 382/128, 129, 133; 250/339.02, 458.1, 459.1, 461.1, 461.2														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	US 4,976,542 A (SMITH) 11 DECEMBER 1990, SEE FIGURES 1 AND 3.	1												
Y,P	US 5,539,517 A (CABIB et al) 23 JULY 1996, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-22,47-63,69												
Y	US 5,377,003 A (LEWIS et al) 27 DECEMBER 1994, SEE FIGURES 8-11	1-69												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"T" Inter documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"T" Inter documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Z" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	"T" Inter documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Z" document member of the same patent family													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 25 MARCH 1997		Date of mailing of the international search report 04 APR 1997												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer SAMUEL A. TURNER Telephone No. (703) 305-4803												

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
G 0 1 B	11/00	G 0 1 J	3/443
G 0 1 J	3/443	G 0 1 N	21/27
G 0 1 N	21/27		21/64
	21/64		33/48
	33/48		33/483
	33/483	G 0 2 B	21/36
G 0 2 B	21/36	A 6 1 B	3/12
(72)発明者	ダリオ カビブ		E
	イスラエル国、ティムラート 23840、ハ		E
	ボルシュ 7		P
(72)発明者	ロバート エー バックワルド		C
	イスラエル国、ラマト イシャイ 30095、		
	ハダガンストリート		
(72)発明者	ツビ マリック		
	イスラエル国、クファー ハロエ 38955、		E